



TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

Bioloogia-geograafiateaduskond

Geneetika ja tsütoloogia kateeder

A n u K õ i v e e r

VERERAKKUDE DIFERENTSEERUMISE MORFOLOOGILISED
KRITEERIUMID

Diplomitöö

Substants
kõrvalmäär
alkaloos

A. Piirsoo
12. II 80

Juhendaja : assist. A. Piirsoo

Tartu 1980

S I S U K O R D

| | |
|---|----|
| SISSEJUHATUS | 4 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 5 |
| 1.1. Rakkude diferentseerumine | 5 |
| 1.2. Kaasaegne vereloometeooria | 7 |
| 1.3. Mononukleaarsete fagotsüütide diferent- seerumisrea rakkude eristamiskriteeriumid | 10 |
| 1.4. Granulotsüütide ja megakarüotsüütide diferentseerimisrea rakkude eristamis- kriteeriumid | 13 |
| 1.5. Tuumakese organisaatori piirkonna argento- fiilsus ja selle seos rRNA tsistronite aktiivsusega | 16 |
| 2. EKSPERIMENTAALNE OSA | 17 |
| 2.1. Materjal ja metoodika | 17 |
| 2.2. Laboratoorsete tööde ohutustehnika | 18 |
| 2.3. Töö tulemused | 19 |
| 2.3.1. Luuüdi tükkeksplantaat-koekultuurid | 19 |
| 2.3.2. Embrüonaalse põrna tükkeksplantaat- koekultuurid | 23 |
| 2.3.2.1. Neutrofiilsete granulotsüütide diferentseerumine | 24 |
| 2.3.2.2. Basofiilsete graanulitega granulotsüüdid | 29 |
| 2.3.2.3. Megakarüotsüütide diferentseerumine . | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2.4. Mononukleaarsete fagotsüütide | |
| diferentseerumine | 34 |
| 2.3.2.5. Lümfotsüüdid | 39 |
| 2.3.3. Tuumakese organisaatori piirkonna | |
| hõbetumine koekultuurides | 40 |
| 3. ARUTELU | 42 |
| KOKKUVÕTE | 46 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 47 |
| RESÜMEED | 56 |

S I S S E J U H A T U S

Kaasajal on bioloogia üheks oluliseks probleemiks rakkude diferentseerumise põhjuste ja mehhanismide selgitamine. Nimetatud küsimusi aitavad selgitada ka morfoloogilised uurimused, sest rakkude diferentseerumisega kaasnevad tavaliselt ka rakkude fenotüübi muutused. Seetõttu on oluline osata identifitseerida rakke morfoloogiliste tunnuste alusel. Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida vererakkude morfoloogilist diferentseerumist.

Vererakkude diferentseerumise uurimine omab nii üldteoreetilist kui ka praktilist tähtsust. Vererakkude diferentseerumishäired võivad põhjustada mitteküpsete vererakkude üleproduktsiooni vereloomeorganeis ja nende rakkude paismist verre, s.o. leukooside teket. Täpne diferentseerumistasmete identifitseerimine võimaldaks uurida erinevate induktorite mõju diferentseerumisprotsessi jätkumisele.

Kuna organismis on vereloomekude väga keerulise struktuuriga ja heterogeense rakulise koostisega, siis on oluline kasutada vererakkude diferentseerumise uurimiseks lihtsustatud mudelsüsteeme. Käesolevas töös on mudelina kasutatud vererakkude diferentseerumise uurimiseks tükkeksplantaat-kultuure.

Autor avaldab tänu ja lugupidamist assistent A.Piirsoole juhendamise ja mitmekülgse abi eest töö teostamisel.

1. K I R J A N D U S E Ü L E V A A D E

1.1. R a k k u d e d i f e r e n t s e e r u m i n e

Paljude autorite andmetele toetudes defineerib tuntud nõukogude tsütoloog I.Tokin diferentseerumise keeruka ja mitmeetapilise protsessina, mis viib rakkude heterogeensusele organismis ning mis seisneb püsivates progressiivsetes muutustes rakkude ainevahetuses ja struktuuris /Токин, 1972/. Mõnikord on kirjanduses termini " rakkude diferentseerumine" asemel kasutusel ka termin "tsütodiferentseerumine" /Кохухов, 1973/. Rakkude jada tüvirakust küpsete rakkudeni nimetatakse diferentseerumise liiniks ehk differoniks.

Üldtunnustatud on rakkude diferentseerumise seos geenide valikulise aktiivsusega. Kuid mehhanismid, mis põhjustavad geenide valikulist avaldumist eukarüootsetes rakkudes on seni suures osas teadmata /Bellairs, 1974; Крик, 1979/. Erinevate autorite poolt on kirjeldatud mitmeid faktoreid, mis mõjutavad geenide valikulist aktiveerumist. Näiteks hormoonide /Дьюкар, 1978; Епифанова, 1965; Мицкевич, 1978/, mediaatorainete /Chan, Metcalf, 1972; Lozzio, 1973/, neuraalse induktsiooni /Reigelly et al., 1976/, aga ka rakkudevaheliste kontaktide /Djaldetti, 1975; Дьюкар, 1978/ osa erinevate rakkude diferentseerumises.

Rakkude diferentseerumise käigus muutub keerulisemaks rakkude struktuur ja avalduvad erinevatele rakkudele omased spetsiifilised funktsioonid /Трумэн, 1976/. Rakkude

diferentseerumine kajastub biokeemilistes ja morfoloogilistes muutustes. Tavaliselt morfoloogiliselt identifitseeritavale diferentseerumisastmele eelneb biokeemiline diferentseerumine /Bellairs, 1974/. "Biokeemiliselt diferentseerunud" rakkudes toimub juba mõni spetsiifiline sünteesiprotsess, kuid need muutused raku funktsioonis ei kajastu veel ka raku struktuuris. Selliseid rakke nimetatakse determineeritud rakkudeks /Трумэн, 1976/.

Kirjanduses on esitatud suur faktiline materjal erineva päritolu ja funktsiooniga rakkude diferentseerumise kohta, kuid sealhulgas on vähe esitatud üldistavaid andmeid, mis näitaksid ka rakkude morfoloogilist diferentseerumist. Diferentseerumise morfoloogiliste tunnustena on esitatud järgmised tunnused: tuuma ja tuumakese suuruse vähenemine; granaarse komponendi osatähtsuse vähenemine tuumakeses ning fibrillaarse komponendi hulga tõus; mitokondrite arvu tõus ja nende struktuuri muutus /maatriksi tihenemine, mis viitab ATP aktiivsele sünteesile/; Golgi kompleksi ja endoplasmaatilise võrgustiku suurenemine. Üldiseks tendentsiks on tsütoplasmas organellide arvukuse tõus ja membraansete elementide kasv /Токин, 1972; Трумэн, 1976/. Diferentseerunud rakkude rakupind on tavaliselt keerulise struktuuriga /raku - jätked/ mistõttu oletatakse rakupinna olulist osa rakkude diferentseerumisprotsessis /Дьюкар, 1978/. Rakkude diferentseerudes tugevnevad tuuma ja tsütoplasma vastastikused suhted, mille morfoloogiliseks väljenduseks on tuumamembraani struktuuri keerukustumine /Maul, Deaven, 1977; Токин, 1972; Трумэн, 1976/.

Erinevates differonides kajastub diferentseerumine spetsiifiliste struktuuride moodustumises rakkude tsütoplasmas või rakkude vahel. On teada, et lihasrakkude diferentseerudes kujunevad neis välja spetsiifilised rakuorganellid - müofibrillid, fibroblastides toimub kollageenikiudude moodustumine rakke ümbritsevasse keskkonda /Хрущов, 1976/. Granulotsüüdis vastavalt nende küpsuse astmele toimub spetsiifiliste graanulite süntees /Besso, 1973; Parmley et al., 1976/.

Teatud ulatuses on diferentseerumine pöörduv protsess. Seoses rakkude ööpäevase rütmiga, aga ka paljude muude protsessidega /regeneratsioon, kultiveerimine ühekihilistes koe-kultuurides/, toimub rakkude dediferentseerumine /Помжаев, 1974; Токин, 1972/. Rakkude dediferentseerumine ei ole rakkude arengupotentsiaalide kadumine, vaid on autoregulatsiooniprotsess /Токин, 1972/. Rakkude dediferentseerumisse tuleb suhtuda siiski mõningase ettevaatusega, sest paljud varem kirjeldatud dediferentseerumisjuhud on tänapäeval selektatud teisiti.

1.2. K a a s a e g n e v e r e l o o m e t e o o r i a

Tänapäeval on üldtunnustatud unitaarne vereloometeooria, mille alusel kõik vererakud pärinevad ühtsest polüpotentseste vereloome tüvirakkude populatsioonist.

Polüpotentsed vereloome tüvirakud on iseennast säilitav rakupopulatsioon, mis on võimeline diferentseeruma erinevates suundades /Хрущов, 1976/. Tüvirakkudel on enesesäilitus-

võime organismi kogu eluea vältel /Чертков, Фриденштейн 1977/. Erinevate diferentseerumissuundade valikumehhanism on selgitamata. Tõenäoliselt määrab tüviraku diferentseerumise suuna:

- 1/ valiku juhuslik protsess,
- 2/ tüviraku individuaalsed erinevused /eelnenud mitootiliste jagunemiste arv/,
- 3/ mikrokeskkonna mõju /Хрущов, 1976/.

Täiskasvanud imetajatel paiknevad vereloome tüvirakud peamiselt luuüdis, tunduvalt vähem /10 korda/ leidub neid põrnas /Metcalf, Moore, 1971/. Enamus tüvirakkudest on mitootilise tsükli G_0 -faasis, vaid ligikaudu 5% neist prolifererub /Metcalf, Moore, 1971/. Selline vahekord on täiesti küllaldane normaalse vereloome kindlustamiseks /Бутенко, 1978/.

Kirjanduse andmetel on vereloome tüvirakk väike $d=8...10 \mu m$ ümmargune mononukleaarne rakk. Tuum on suur, milles kromatiini lokalisatsioon on ühtlane ning milles paikneb üks kuni kaks tuumakest. Tuuma ja tsütoplasma suhe on 1. Tsütoplasma on suhteliselt sisaldiste vaene: puuduvad Golgi tsoon ja lüsoosoomid, mitokondrid on väikesed ja ümmargused. Palju on vabu ribosoomi ja polüribosoomi /Dicke et al., 1973; Fukuda, 1973; Rubinstein, Trobaugh, 1973; Бутенко, 1978/. Kuna aga vereloome tüvirakul puuduvad temale ainuomased morfoloogilised tunnused, siis on vereloome tüviraku täpne identifitseerimine raske.

Vereloome tüvirakud võivad potentsiaalselt diferentseeruda kõikides arengusuundades. Vereloome tüvirakke, millel on

aktiveerunud geenide grupid, mis on iseloomulikud kindla diferentseerumissuunaga rakkudele, nimetatakse determineeritud tüvirakkudeks /Хрущов, 1976; Чертков, Фриденштейн, 1977/.

Determineeritud vereloome tüvirakud on morfoloogiliselt vereloome tüvirakust eristamatud, kuna spetsiifiliste geenide aktiveerumisest kuni produktide ilmumiseni läheb vaja aega. See aeg ongi determineeritud tüvirakkude periood, mil rakkudel puuduvad veel eristamiskriteeriumid, kuid nad on võimelised diferentseeruma vaid ühes kindlas suunas, need rakud on determineeritud kindlale arengusuunale. Juba eristatavaid rakke nimetatakse eellasrakkudeks.

Vereloome tüvirakud diferentseeruvad algselt kahes suunas: müelopoeesi ja lümfopoeesi eellasrakkudeks /Чертков, Воробьев, 1973/. Müelopoeesi eellasrakk diferentseerub edasi neljas suunas, moodustades küpseid erütrotsüüte, makrofaage, granulotsüüte ja trombotsüüte. Lümfopoeesi tüvirakk diferentseerub B või T lümfotsüütideks, mille edasine areng vastavalt kas plasmarakkudeks või T-blastideks toimub immunogeneesi protsessis antigeense stimulatsiooni korral /Чертков, Фриденштейн, 1977/. Sellist rakkude arengu rida nimetatakse diferentseerumise reaks ehk differoniks, ning selle moodustavad: a/ tüvirakud, b/ eellasrakud, c/ küpsed diferentseerunud rakud /Хрущов, 1976/.

Uemas kirjanduses on käsitletud ka vereloome tüviraku diferentseerumise ehk geenide valikulise aktivatsiooni põhjusi. Uurimused näitavad, et vereloome tüviraku diferentseerumise suunda mõjutab neid rakke ümbritsev keskkond ehk nn. mikrokeskkond, mille üheks oluliseks komponendiks on vere-

loomeorganite stroomarakud /McCuscey et al., 1975; Tavassoli, 1975; Trentin, 1970; Weiss, 1976/. Mikrokeskkonnas taga - takse vereloome tüviraku diferentseerumine erinevates arengu suundades kas otseselt erinevate stroomarakkude ja vereloome tüvirakkude kontakti teel /Cline, Golde, 1975; Haskill et al., 1972; La Pushin, Trentin, 1977/ või stroomarakkude poolt produtseeritud erinevate ainete kaudu /Chan, Metcalf, 1972; Lord et al., 1974; Reed, 1974; Wolf, 1974/.

Tuleb siiski öelda, et stroomarakkude vereloome tüviraku diferentseerumissuundade äramääramisel on jäänud paljuski ebaselgeks seoses vereloomeorganite strooma rakulise heterogeensusega /Старостин, Мичурин, 1977/. Probleemi lahendamisel on oluliseks panuseks uuringud, mis lähtuvad mingist konkreetsest vereloomeorganite stroomarakust ja selle võimalikust mõjust tüviraku diferentseerumisele.

1.3. Mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisreakkude eristamiskriteeriumid

Mononukleaaarsed fagotsüüdid on rakud, mis moodustavad hulkrakse organismi kaitsesüsteemi ning mis osalevad organismi spetsiifilises immuunkaitstes /Kapp, 1978/.

Kaasajal on veenvalt tõestatud, et mononukleaaarsed fagotsüüdid e. makrofaagid pärinevad vereloome tüvirakust. Vereloome tüvirakk diferentseerub monoblastiks, edasi promonotsüüdiks. Promonotsüüdid moodustavad edasisel küpsemisel monotsüüdid, mis migreerivad verre. Monotsüüdid omakorda

võivad migreeruda koesse, kus me nimetame neid koe makrofaagideks /varasemas kirjanduses ka histiotsüütideks/ /Kapp, 1978; Ван Фюрт и др., 1973/.

Seniste uurimuste põhjal on enamuses töödes mononukleaarsete fagotsüütide esimeseks eristatavaks eelarakuks monoblast. Van Furthi ja Fedoruko /1976/ andmetel on monoblast ümar rakk diameetriga 8...10 μm ; Cline ja Sumneri /1972/ andmetel on aga raku diameeter hoopiski 12...25 μm . Tuuma ja tsütoplasma suhe on suurem kui 1. Tuum on ümar, ühe kuni kolme väljapaistva tuumakesega. Tsütoplasmas on palju polüribosoome ja suured mitokondrid ning mõningad väikesed graanulid, Van der Meeri ja kaastööliste /1979/ andmetel omavad graanulid tugevat peroksidaasi aktiivsust. Mõningane peroksidaasi aktiivsus on täheldatav ka granulaarsel tsütoplasmaatilisel retiikulumil ja tuumaümbrisel. Monoblastid omavad ka α -naftüülbutüraatesterasaasi aktiivsust /Goud et al., 1975/. Monoblasti Golgi kompleks on vähe arenenud. Peroksidaasi aktiivsus mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisreas langeb seoses rakkude küpsemisega. Kõrget aktiivsust omavad peale monoblastide ka promonotsüüdid. Monotsüütide peroksidaasi aktiivsus on vähene ning makrofaagidel puudub üldse. Samal ajal tõuseb mononukleaarsetes fagotsüütides seoses rakkude küpsemisega happelise fosfataasi aktiivsus, olles kõige kõrgem küpsetes makrofaagides /Goud et al., 1975/.

Valgusmikroskoopilise uuringuga on raske eristada promonotsüüti granulotsüütide diferentseerumisrea rakust promüelotsüüdist. Nende eristamiseks on kaks kriteeriumi /Hirsch,

Fedorko, 1970/: 1/ rakupinna erinev struktuur /promonotsüü-
dil ebaregulaarselt sagardunud, promüelotsüüdil tasane/, 2/
tsütoplasma graanulite erinev hulk ja paigutus /promono -
tsüüdis vähe, paiknevad rakupinna ja tuuma vahelises alas,
promüelotsüüdis palju, paiknevad rakupinna lähedal/. Promo-
notsüüdid on koekultuuris nõrgalt lamestunud rakud, millel
on tavaliselt üks pseudopood /Goud et al., 1975/. Tuuma ja
tsütoplasma suhe on ligikaudu 1 /Goud et al., 1975; van Furth,
Fedorko, 1976/. Raku diameeter on umbes 12...20 μm , Karri and-
metel /Kapp, 1978/ aga tunduvalt väiksem - 7...15 μm . Suur
tuum on mitme tuumakesega. Tsütoplasmas on palju polüribosoo-
me, hästi arenenud Golgi kompleks ning esineb palju väikesi
graanuleid.

Monotsüüdid on kultuuris veidi käävjamad rakud diameetriga
10...20 μm . Tuuma ja tsütoplasma suhe on umbes 1. Tuum on oa-
kujuline ja vaevalt nähtavate tuumakestega. Rakupind on sile,
esineb vaid üksikuid sõrmekujulisi tsütoplasma väljasopisti-
si. Tsütoplasmas on vähe polüribosoomi ja elektrontihedaid
graanulaid.

Makrofaagid on koekultuuris hästi lamestunud erineva kuju-
ga rakud, mis enamasti omavad kaht pseudopoodi /Goud et al.,
1975/. Tuuma ja tsütoplasma suhe on väiksem kui 1. Diameeter
võib olla kuni 50 μm /Gordon, Cohn, 1970/. Tuum on ümar või
ovaalne mitme väljapaistva tuumakesega, tuuma ümber on hul-
galiselt elektrontihedaid graanuleid. Tsütoplasmas on palju
lüsosoome, mitokondreid, fagotsütoosi vakuole, hästi on are-
nenud Golgi kompleks, Eriti iseloomulikuks on makrofaagidele
tugevalt kurdunud plasmamembraan sõrmekujuliste lingudega /Spec-
tor, 1974 a ja b/.

Mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisrea rakku-
des suureneb koos rakkude küpsemisega fagotsütoosi- ja pino-
tsütoosivõime. Samuti tõuseb IgG pinnaretseptorite arv ja
kinnitumisvõime klaasile. Oluliseks tunnuseks nimetatud dif-
feroni rakkude identifitseerimiseks on lüsoosoomide järjest
suurenev hulk seoses rakkude küpsemisega.

1.4. Granulotsüütide ja megakarüo- tsüütide diferentseerumisrea rakkude eristamiskriteeriu- mid

Vererakkude diferentseerumist on uuritud nii erinevatel
mudelitel kui ka mõjustamata vereloomekoes /Metcalf et al.,
1975; Zucker-Franklin, Grusky, 1974; Мyp, Меткалф, 1973/. Kui
vereloomerakkude biokeemiline diferentseerumine, see tähen-
dab mingite spetsiifiliste valkude süntees, on seni peaaegu
tundmata /Lajatha, Schofield, 1974/, siis hoopis rohkem and-
meid on esitatud morfoloogiliste diferentseerumiskriteeriu-
mite kohta.

Granulotsüütide diferentseerumisrea esimeseks identifitse-
ritavaks rakuks on müeloblast. Müeloblast teeb läbi ühe mi-
toosi. Tuum on ümara või ovaalse kujuga, milles on näha kro-
matiini õrn võrkjas struktuur ja kaks kuni viis tuumakest.
Tsütoplasmas on vähe tsütoplasmaatilise võrgustiku elemente,
lamellooskompleks esineb väikeste vesiikulitena. Tsütoplasmas
ribosoomid /Bainton et al., 1971; Wetzel et al. 1967/.

Promüelotsüüt läbib samuti ühe mitoosi. Temal võtab suure-
ma osa rakust enda alla tuum. Tuumas on üks või kaks tuuma -

kest, ning kromatiin on mõnevõrra rohkem kondenseerunud kui müeloblastidel. Tsütoplasmas on suurenenud tsütoplasmaatilise võrgustiku elementide hulk. Mitokondreid on palju, kuid vähenenud on ribosoomide arv.

Spetsiifiliseks tunnuseks, mis eristab promüelotsüüte müeloblastidest on graanulite esinemine promüelotsüütide tsütoplasmas /Spicer, Hardin, 1969/. Esineb nii mitteazurofiilseid kui ka azurofiilseid graanuleid, ning lõplikult formeerunud graanuleid /Brederoo, Daems, 1978/.

Müelotsüüt läbib kaks mitoosi. Tuum on suur. Tuumad on kujult väga erinevad - ovaalsest kuni hobuserauakujuliseni. Tuumas puuduvad tuumakesed. Kromatiini võrkjas struktuur on peaaegu kadunud, kuid on suurenenud kondensatsioon tuumakatte lähedale /Spicer et al., 1968/.

Tsütoplasmas esineb tugevalt värvunud basofiilseid^{ja} eosinofiilseid sõmeraid, kuid ka nõrgalt värvunud sõmeraid. Sellest võib järeldada, et müelotsüütide staadiumis on esmakordselt selgelt eristatavad granulotsüütide erinevad diferentseerumissuunad. Seda kinnitavad ka elektronmikroskoopilised andmed, mis näitavad, et eelpoolmainitud granulatsiooni rakus annavad nn. spetsiifilised graanulid /Bainton et al., 1971; Zucker-Franklin, Grusky, 1974/.

Metamüelotsüüdi tuum on müelotsüüdi tuumast väiksem, oakujuuline või osaliselt segmenteerunud. Kromatiin on tugevalt kondenseerunud tuumakatte lähedal. Tuumakesed tavaliselt puuduvad. Tsütoplasmas on tunduvalt suurenenud graanulite hulk. Teisi tsütoplasmaatilisi organelle on vähe. Metamüelotsüüdis leiduvad graanulid jagatakse kolme tüüpi - primaarsed, sekun-

daarsed ja spetsiifilised. Spetsiifilised graanulid on ai-
nuomased vaid vastavale diferentseerumisliinile / Чертков,
Фриденштейн , 1977/.

Kõrgelt diferentseerunud granulotsüüdid on ümarad rakud,
mille tuumad on tugevalt sagardunud. Tuumas on kromatiin
kondenseerunud tuumakatte lähedale, tuumakesed ei ole eris-
tatavad. Tsütoplasmas esineb spetsiifiline granulatsioon,
mille alusel rakud jagatakse neutrofiilseteks, eosinofiilse-
teks ja basofiilseteks granulotsüütideks. Graanulid on täp-
selt identifitseeritavad nii spetsiifilise varvumise alusel
kui ka ultrastruktuuri poolest /Bainton et al., 1971; Brederoo,
Daems, 1978; Zucker-Franklin, Grusky, 1974/.

Granulotsüütide diferentseerumise kohta võib kokkuvõttes
öelda, et diferentseerumise käigus toimuvad järgmised oluli-
sed muutused: tuumade kuju järkjärguline muutus ümaratest
sagarikulisteni, kromatiini kondensatsiooni suurenemine ja
spetsiifiliste graanulite moodustumine rakkude tsütoplasmas.

Megakarüotsüütide morfoloogilise diferentseerumise koh-
ta on kirjanduses vähe andmeid. On teada, et diferentseeru-
mise käigus toimub nii rakutuuma kui ka rakkude endi suure-
nemine /Bentfeld-Barker, Bainton, 1977/. On teada, et selle-
ga kaasneb rakutuuma polüploidiseerumine /Metcalf et al.,
1975/. Megakarüotsüütides võib valgusmikroskoopiliselt eris-
tada tsütoplasma struktureeritust. Elektronmikroskoopiliste
uuringute alusel on tuvastatud, et see struktureeritus vastab
nn. determinatsiooni joonele - omaparasele membraansüsteemi-
le nende rakkude tsütoplasmas / Bentfeld-Barker, Bainton,
1977; Inzumi et al., 1977/.

1.5. Tuumakese organisaatori piirkonna argentofiilsus/ja selle seos rRNA tsistronite aktiivsusega

Kasutades Goodpasture ja Bloom'i /1975/ metoodikat tuumakese organisaatori piirkonna väljatoomiseks, näeme me in - terfaasi tuumades hõbetunud tuumakese organisaatori piir - kondi mustade känkudena. Metafaasis lokaliseerub hõbetuv ma - terjal akrotsentriliste kromosoomide lühikeste õlgade sekun - daarsoonistel /Mikelsaar, Schwarzacher, 1978/. Tuumakese or - ganisaatori piirkondade arv erinevatel objektidel /inimene, hiir, merisiga, küülik, rott/on varieeruv /Hafgärtner et al., 1979/. Kõige tõenäolisemalt on hõbetuvaks materjaliks RNA-ga seostunud happelise valgu komponent, mis paikneb ümber aktiiv - se tuumakese organisaatori piirkonna /Schwarzacher et al., 1978/.

Rakus tuumakese organisaatori piirkondade hõbetumine vas - tab selle raku geneetilisele aktiivsusele /Hausmann et al., 1978; Schwarzacher et al., 1978; Sidebottom, Deak, 1976/. Seda kinnitavad ka katsed aktiivsete ja inaktiivsete lümfo - tsüütidega /Schwarzacher et al., 1978/ ning inimese ja hii - re somaatiliste rakkude hübriididega, kus inimese geneetiline materjal on inaktiivses olekus ning tuumakese organisaatori piirkond ei värvu hõbedaga /Tantravahi et al., 1976/.

Geneetiliselt inaktiivsetes rakkudes, nagu küpsed granulo - tsüüdid ja mittestimuleeritud lümfotsüüdid, hõbetumist ei esi - ne.

2. E K S P E R I M E N T A A L N E O S A

2.1. M a t e r j a l j a m e t o o d i k a

Käesolevas töös uuriti vererakkude diferentseerumist täiskasvanud hiire C3H luuüdi ja vastsündinud hiirte põrna tükkeksplantaat-koekultuurides, kus eksplanaati kasvatati katteklaasidel, plastik Petri tassidel ja membraanfiltritel. Koekultuur kasvatati katteklaasidel penitsilliini pudelites Eagle'i või nr.199 söötmes, millele lisati 20% veise seerumit ja bakteriaalse saastumise vältimiseks penitsilliini ning streptomütsiini /100 üh/ml/. Rakkude kasvu soodustamiseks lisati söötmele 5-10% embrüonaalekstrakti.

Luuüdi ja põrn purustati võimalikult väikesteks tükkideks ning kinnitati tuviplasmaga katteklaasidele. Koekultuurid valmistati steriilses boksis ja kasvatati termostaadis temperatuuril 37°C.

Ülevaatepreparaadi saamiseks fikseeriti koekultuur katteklaasil Carnoy fiksaatoris ning värviti hematoksüliini ja eosiiniga. Epoksü-vaiku sisestatud materjal värviti polükroom-selt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga. Ensüümidest uuriti happelise fosfataasi, peroksidaasi ja mittespetsiifiliste esteraaside aktiivsust. Happelise fosfataasi aktiivsust määrati Gomori meetodil Holti modifikatsiooniga. Koekultuur fikseeriti Bakeri fiksaatoris 24 tundi temperatuuril 0-+4°C , inkubeeriti 0,5 tundi temperatuuril 37°C ja substraadiks oli Na-β-glütserofosfaat /Mpc, 1962/.

Peroksidaasi määrati Romeo ja kaastööliste /1973/ poolt väljatöötatud meetodika alusel: kultuur fikseeriti 1 minut

atsetoonis, inkubeeriti 2 tundi toatemperatuuril, substraatideks olid perhüdrool ja 3,3'-diami~~n~~obensidiintetra hüdrokloriid.

Esteraase määrati Li ja kaastööliste /1972/ poolt välja töötatud metoodika alusel: koekultuur fikseeriti 10 minutit Bakeri fiksaatoris, inkubeeriti 5 minutit toatemperatuuril. Substraatideks olid naftool-AS-MX-atsetaat, naftool-AS-D-atsetaat ja β -naftüülatsetaat. [Hõbetati Goodpasture ja Bloomi /1975/ metoodika järgi. Selleks koekultuur katteklaasil kuivatati õhu käes ja värviti 50% Ag NO₃ lahusega. Inkubeeriti 10 minutit 200 W elektripirni all, 20 cm kaugusel. Uuritud materjal fikseeriti te erineva ajavahemike järel ühest päevast kuni nelja nädalani.

2.2. L a b o r a t o o r s e t e t ö ö d e o h u t u s t e h n i k a

Töö teostamisel jälgiti üldisi laboratoorse töö ohutustehnika ja töökaitse nõudeid /ПРАВИЛА ..., 1966/. Iga erioperatsiooni teostamisel sektorisiseseid töökaitse eeskirju. Lenduvate ja mürgiste ainetega töötamisel toimusid kõik operatsioonid tõmbekapi all. Jälgiti, et lenduvad ained ei satuks hingamisteedesse. Tõmbekapi all toimusid ka kõik tööd hapete ja tugevate leelistega /Ritslaid, 1971/.

Epoksüvaikudega töötati selleks spetsiaalselt sisseseatud töökohal ning kummikinnastes, lähtudes eeskirjadest /САН - ТАРНЫЕ ..., 1972/. Elektrilise aparatuuriga töötamisel jälgiti hoolikalt, et nad oleksid maandatud, pärast töö lõpetamist lülitati aparatuur vooluvõrgust välja /Tarbijate ..., 1972/.

Mikroskopeerimisel kasutati silmade kaitseks intensiivse valguse eest valgusfiltreid.

Enne tööleasumist TRÜ ÜMPI-s instrueeriti autorit kõikides töökaitssesse puutuvates küsimustes.

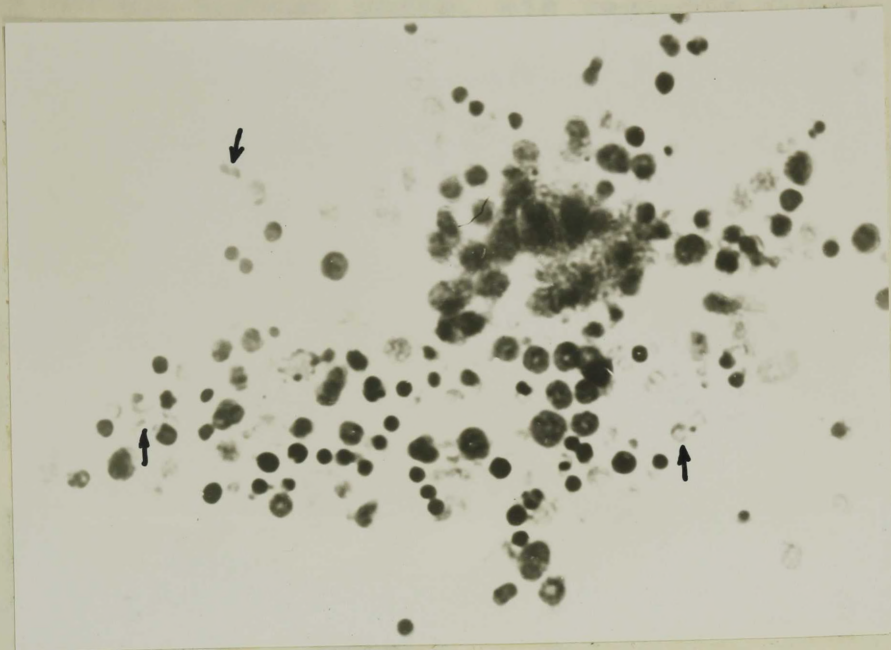
2.3. T ö ö t u l e m u s e d

2.3.1. Luuüdi tükkeksplantaat-koekultuurid

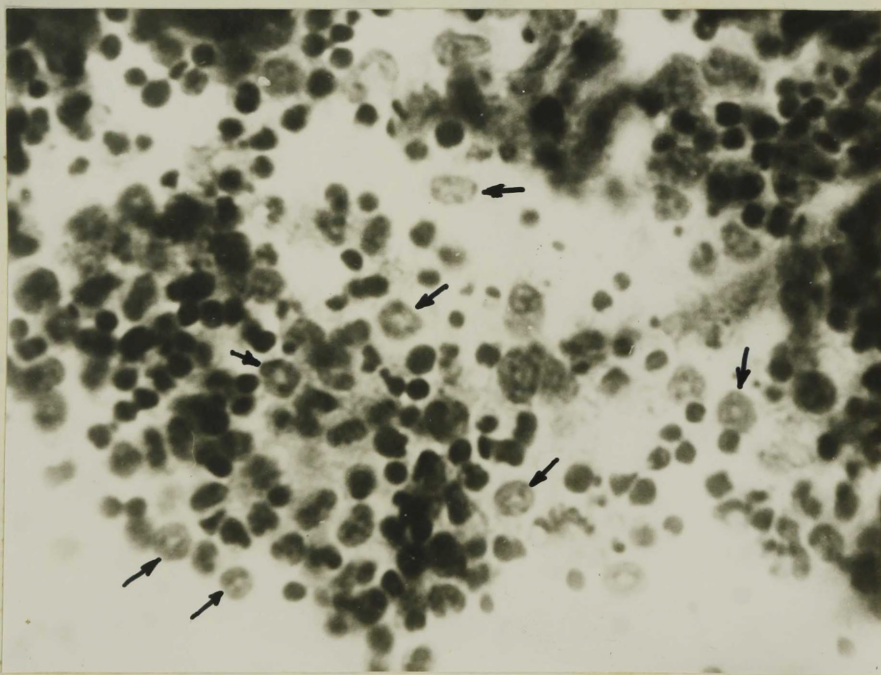
Esimestel päevadel säilivad kultuuris erinevad vererakkude diferentseerumissuunad. Erütropoeesist annab tunnistust erütroidsete rakkude esinemine tsentraaltükis ja selle vahetus läheduses. Huvitav on märkida, et osal erütroidsetest rakkudest on tuum fragmenteerunud. Võib oletada, et erütroidsete rakkude küpsemisel toimub tuuma väljaheitmine osade kaupa, mitte tervikuna.

Järgnevalt toimub kultuuris ulatuslik vererakkude degeneratsioon, mistõttu kõikjal eksplantaadi ümber võib näha rakkude fragmente /joon.1/.

Luuüdi koekultuurides jätkub vereloome lühikeseks ajaks uue tõusuga kolmandal päeval. Esineb kaks põhilist vererakkude diferentseerumissuunda - mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisrida ja neutrofiilsete granulotsüütide diferentseerumisrida. Kultuuris esineb ümara tuumaga monoblaste ja monotsüüte. Leidub ka üksikuid suuri $d=25-30\mu m$ suure tuumaga osaliselt lamestunud makrofaage. Granulotsüütide rearakkude hulgas on palju rõngastuumalisi rakke. Samuti ka



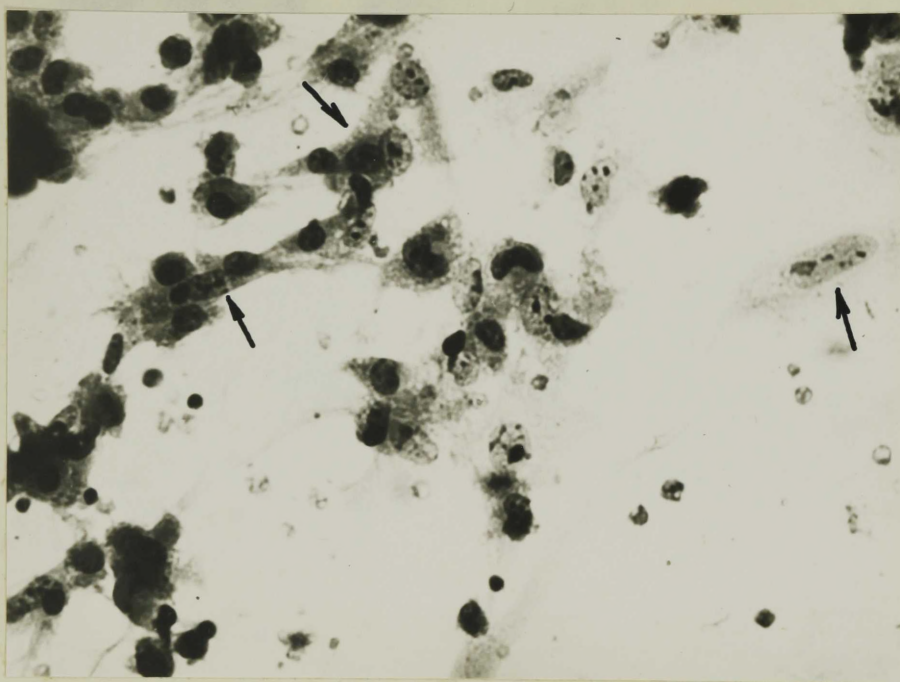
Joon.1. Luuüdi tükkeksplantaat-koekultuur. ↑ - degene-
reerunud rakud. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-
eosiiniga, ob.9x , ok. 10x



Joon.2. Granulotsüütide differentseerumisrea rakud
luuüdi koekultuuris. ↑ - rõngastuumalised rakud. Ülevaate-
preparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 9x, ok. 10x

suure neerja tuumaga rakke, mis vastavad promüelotsüütidele. Vähe on segmenteerunud tuumaga rakke /joon.2/.

Teisel-kolmandal päeval toimub kultuuris esimeste luuüdi stroomarakkude väljakasv. Luuüdi stroomarakud moodustavad fibroblasti tüüpi rakkude kasvutsooni ümber eksplanaadi, kuid see kasvutsoon ei kujune tavaliselt nii ulatuslikuks, nagu põrnakultuurides /joon.3/.

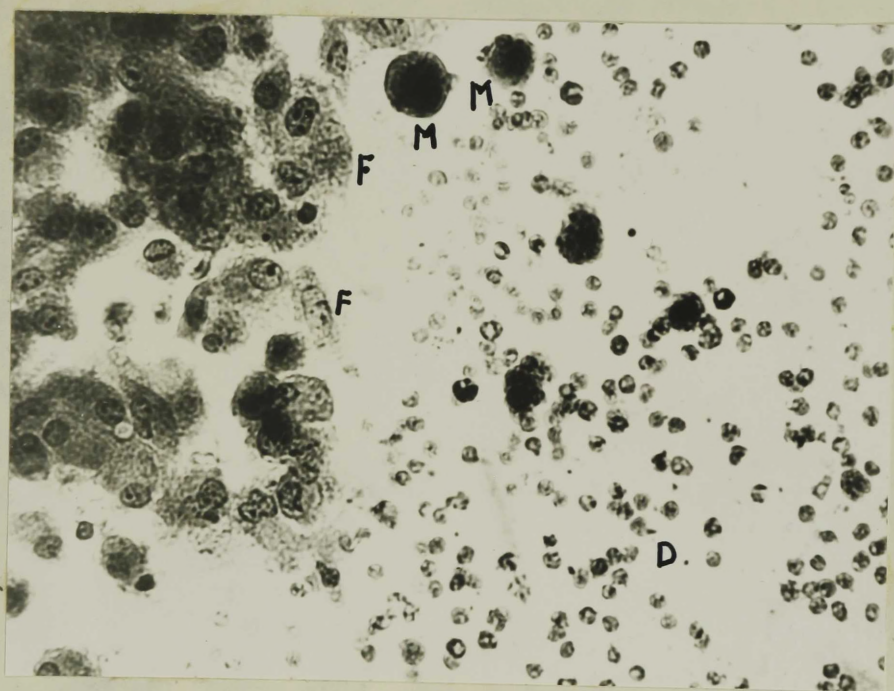


Joon.3. Fibroblasti-tüüpi stroomarakud luuüdi koekultuuris /↑/. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 20x, ok. 10x

Kultuuris säilivad ka kõrgelt diferentseerunud makrofaagid, milledest osade pinnal paiknevad erütrotsüüdid või lümfotsüüdid, osa sisaldab aga tsütoplasmas arvukalt graanuleid.

Edasisel kultiveerimisel rõngastuumaliste granulotsüütide

hulk väheneb. Viiendal päeval on granulotsüüte juba väga hajusalt. Vereloome on koekultuuris praktiliselt lõppenud. Koetüki ümber moodustunud fibroblasti-tüüpi rakkude kasvu-
tsoonis võib täheldada degenerereerunud rakke ja erinevais kultuurides erineval hulgal küpseid mononukleaarseid fagotsüüte /joon.4/.

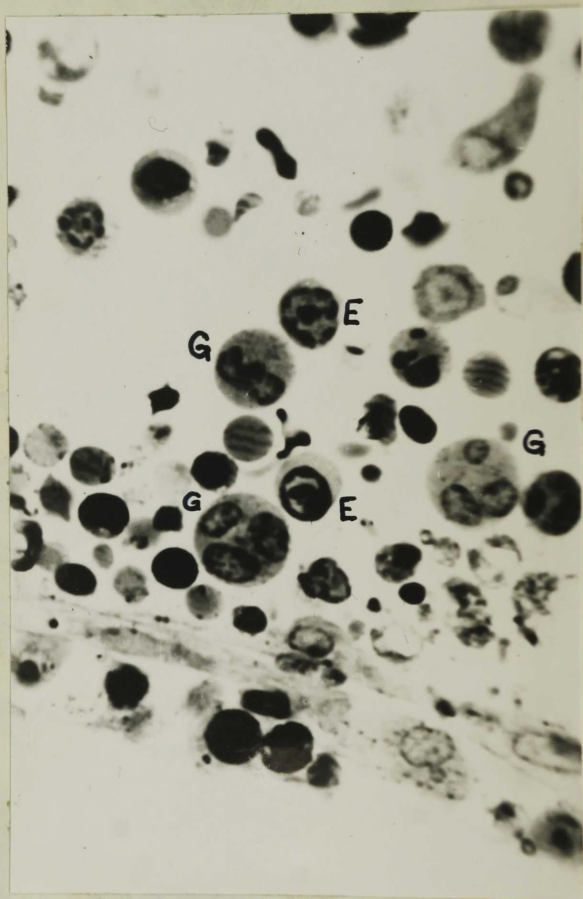
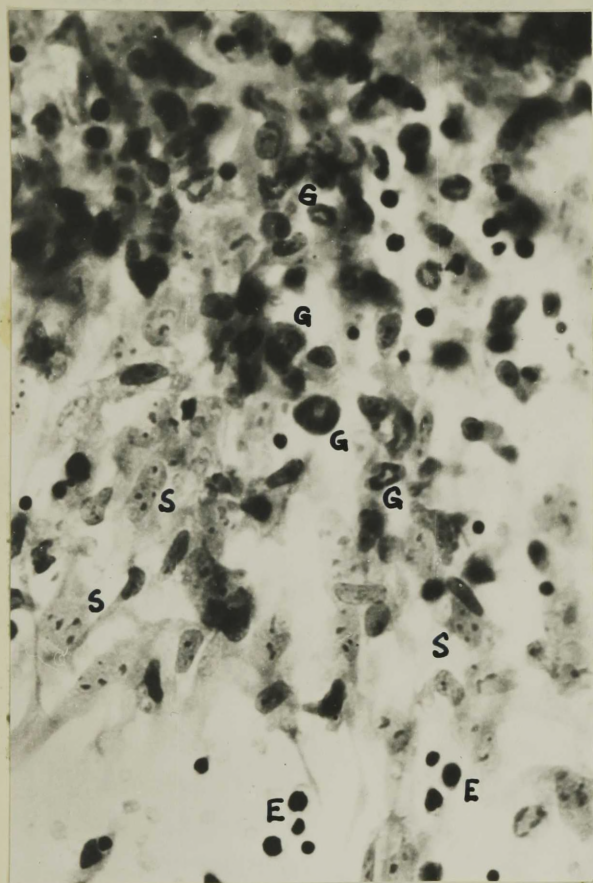


Joon.4. Nädala vanune luuüdi koekultuur. F- fibroblasti-tüüpi rakkude kasvutsoon, M- mononukleaarsed fagotsüüdid, D- degenerereerunud rakud. Ülevaate preparaate, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 20x, ok. 10x

Plastik-Petri tassidel luuüdi koekultuurid püsivad veelgi lühemat aega kui klaasil, kuna enamikul juhtudel ei toimu eksplanaadist stroomarakkude väljakasvu.

2.3.2. Embrüonaalse põrna tükkeksplantaat-koekultuurid

Kultiveerimise esimestel päevadel sarnanevad embrüonaalse põrna koekultuurid luuüdi koekultuuridele: säiluvad vereloomed erinevad diferentseerumissuunad. Nendes koekultuurides säiluvad mõne päeva jooksul erinevas arengustaadiumis erütroidse rea rakud. Kõrvuti erütroidsete rakkudega leidub arvukalt ka granulotsüütide diferentseerumisrea rakke /joon.5a,b/.



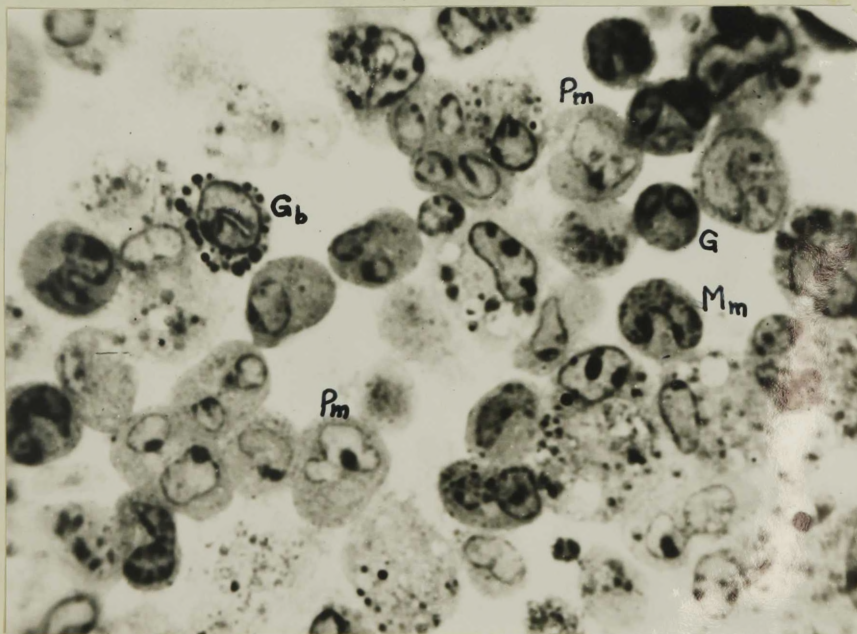
Joon.5. Embrüonaalse põrna rakud kahepäevases koekultuuris. E- erütroidsed rakud, G- granulotsüüdid, S-stroomarakud. a/ ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 9x, ok. 12,5x. b/ preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok. 10x

Intensiivsemalt kui luuüdi koekultuurides toimub põrna koe-
kultuurides stroomarakkude väljakasv /joon.5a/.

Valdav osa vere vormelementidest hävib esimeste päevade
jooksul. Kolmandal-neljandal päeval võib täheldada uut ve-
reloome intensiivistumist. Uus vereloome tõus koekultuuris
toimub vaid siis, kui põrna stroomarakud moodustavad kas-
vutsooni ümber tükkeksplantaadi. Põrna tükkeksplantaat-kul-
tuuris säiluvad peamiselt kolm vererakkude diferentseeru-
missuunda: neutrofiilsete granulotsüütide, megakarüotsüüti-
de ja mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisread.
Üksikutel juhtudel leidsime basofiilsete graanulitega gra-
nulotsüütide ja harva säilisid koekultuuris ka lümfotsüüdid.

2.3.2.1. Neutrofiilsete granulotsüütide diferentseerumine

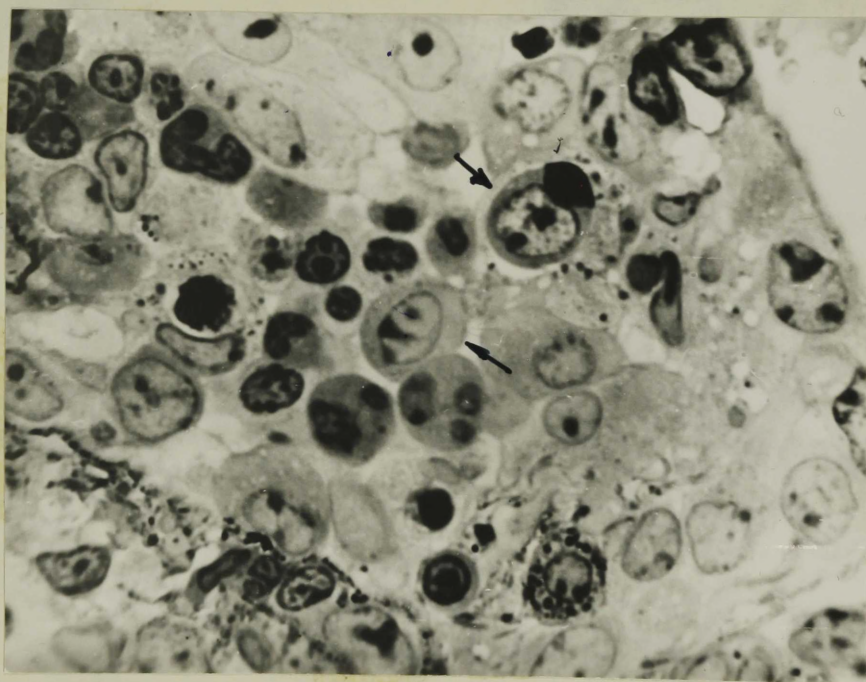
Neutrofiilsed granulotsüüdid paiknevad kogumikena ja üksi-
kult stroomarakkude pinnal või kahe stroomarakkude kihi vahel.
Antud kogumike puhul on tegemist kolooniatega /joon.6/.



Joon.6. Granulotsüütide erinevad arenguastmed. Pm - pro-

müelotsüüt, Mm-metamüelotsüüt, G-granulotsüüt, Gb-basofiilsete graanulitega granulotsüüt. Preparaat epoksü-vaikusisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok. 10x

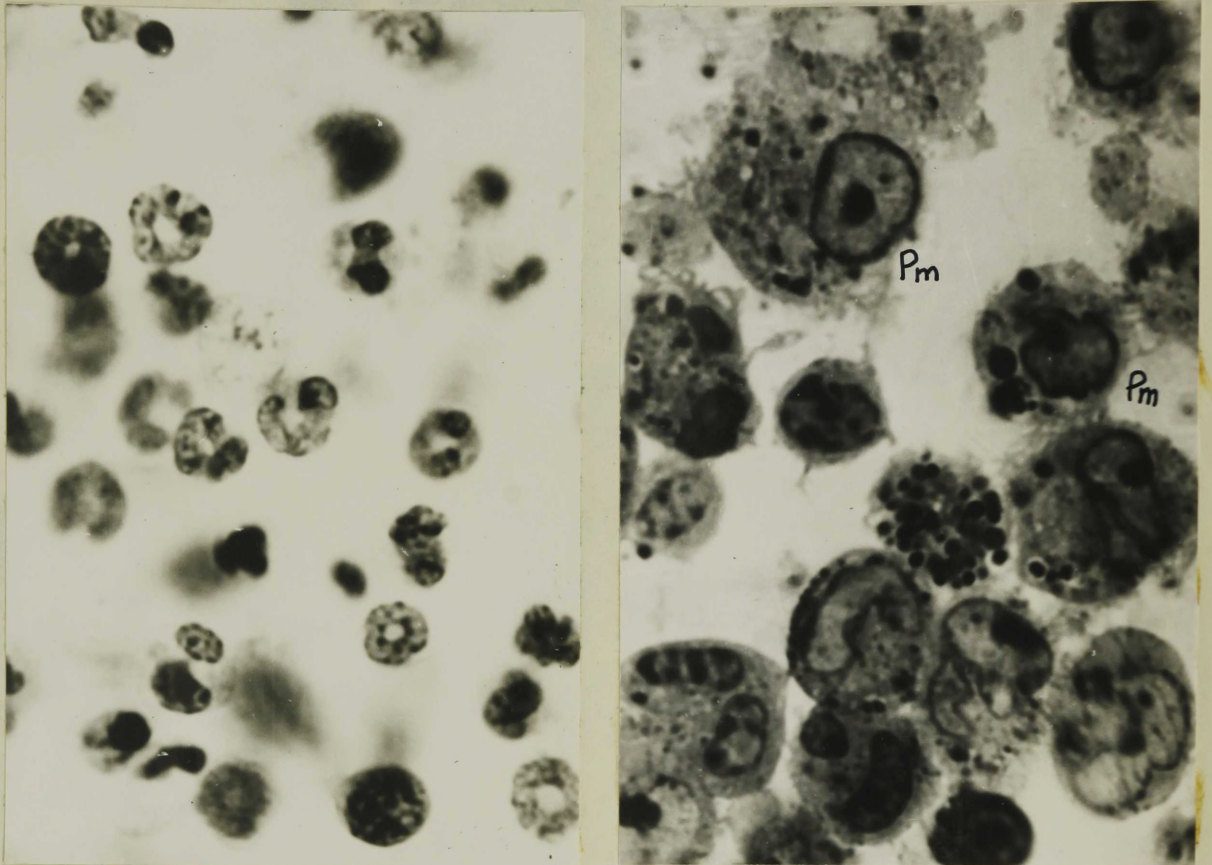
Müeloblastid on koekultuuris ümara või ovaalse tuumaga, milles praktiliselt puudub kromatiini kondensatsioon. Tuumas on kaks kuni kolm küllaltki suurt tuumakest. Tsütoplasma on basofiilne ning vaheste sisaldistega /joon.7/.



Joon.7. Müeloblastid /↑/ embrüonaalse põrna koekultuuris. Preparaat epoksü-vaikusisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok. 10x

Promüelotsüüdid ja müelotsüüdid on koekultuuris rõngasja või hobuserauakujulise tuumaga. Tuumas võib täheldada mõnin-

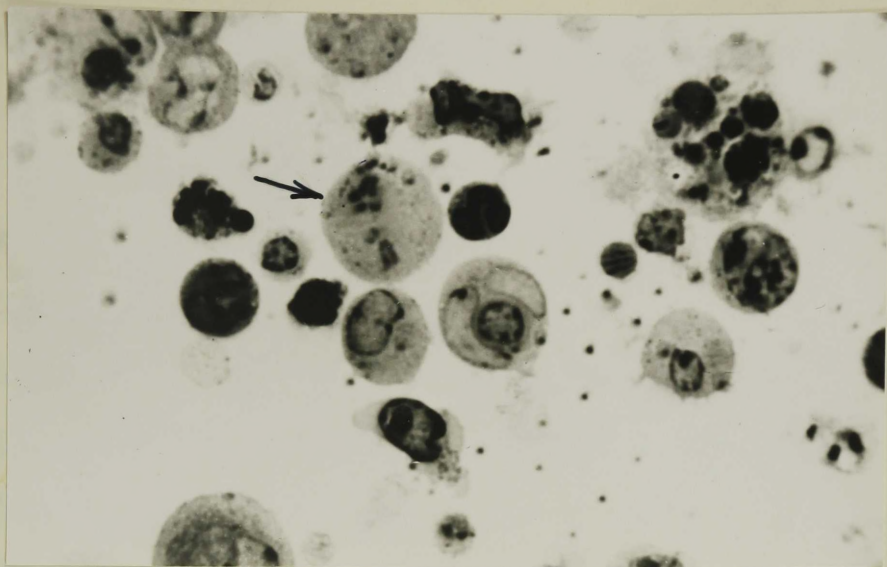
gat kromatiini kondenseerumist tuumakatte ümber. Tsütoplasma basofiilsus võrreldes müeloblastidega on vähenenud. Tsütoplasmas leidub intensiivsemalt värvunud graanuleid /joon. 8a, b/.



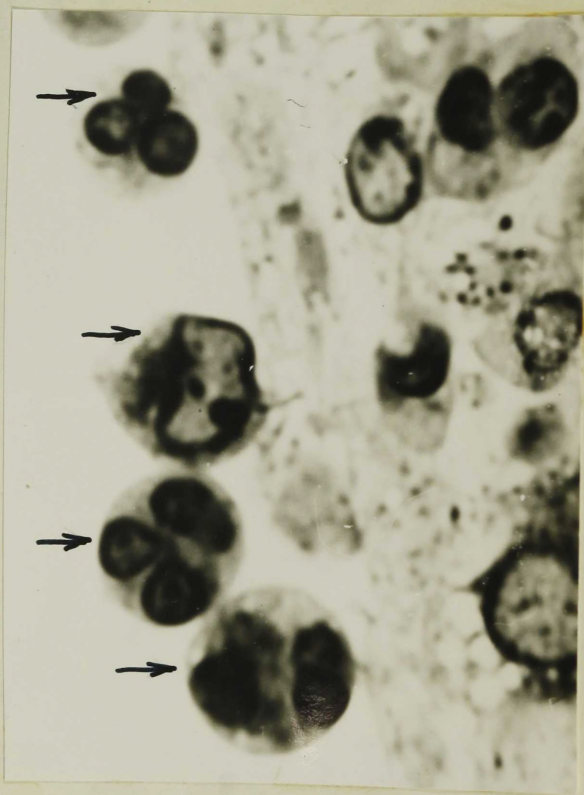
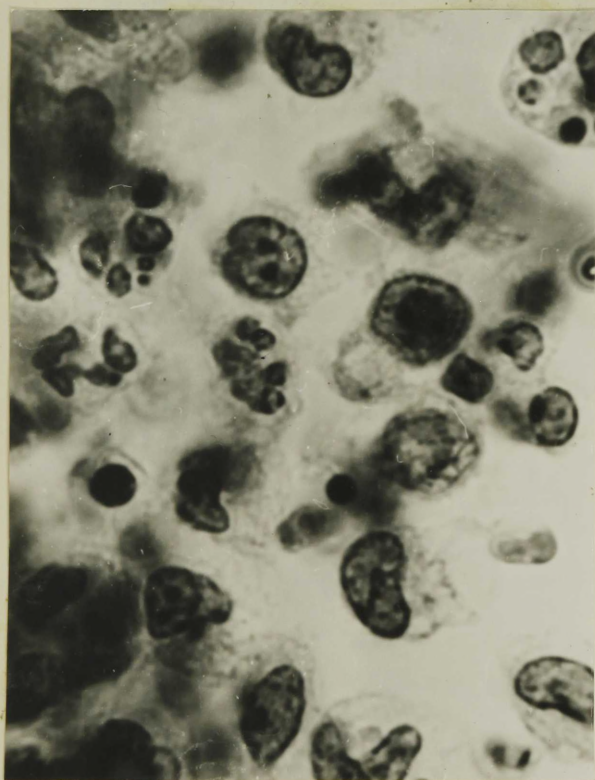
Joon.8. Promüelotsüüdid ja müelotsüüdid embrüonaalse põrna koekultuuris. P_m -promüelotsüüt. a/ ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 20x, ok. 12,5x. b/ preparaate epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 60x, ok. 10x

Et promüelotsüüdid on võimelised koekultuuris jagunema, sellest annavad tunnistust leitud mitoosid /joon.9/.

Metamüelotsüüdid ja granulotsüüdid /joon. 10 a, b/ on tavaliselt tugevalt sagardunud tuumadega. Tsütoplasma baso-



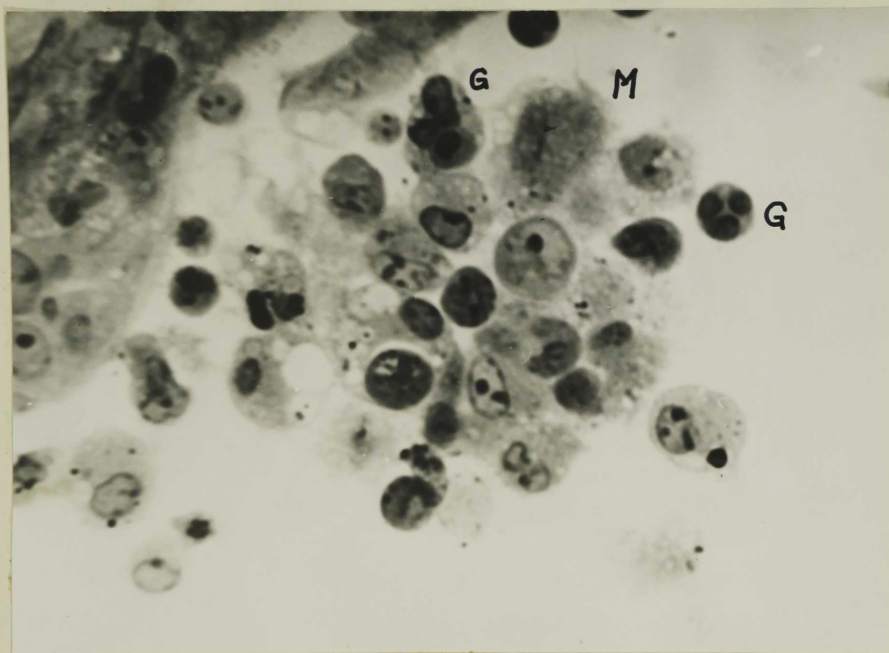
Joon.9. Promüelotsüüdi mitoos /↑/ embrüonaalse põrna
koekultuuris. Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist,
värvitud azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok.10x



Joon.10. Metamüelotsüüdid ja granulotsüüdid /↑/ embrüo-
naalse põrna koekultuuris a/ülevaatepreparaat , värvitud he-
matoksüliin-eosiiniga, ob.20x, ok. 12,5x, b/ preparaate epok-
sü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud azuur-eosiini ja
aluselise fuksiiniga, ob. 60x, ok. 10x

fiilsus võrreldes diferentseerumisrea eelnevate rakkudega on tõusnud. Kromatiin tuumas on sageli kondenseerunud tuuma - katte lähedusse. Osal rakkudest värvub kogu tuum intensiivselt basofiilsete värvidega.

Embrüonaalse põrna koekultuurides leiti rakkude kogumikke, mis sisaldasid erineva diferentseerumissuunaga rakke. Kõige tavalisemateks olid granulotsüütide ja mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumislüüsi erineva arengutasemega rakkude segakolooniaid /joon. 11/.

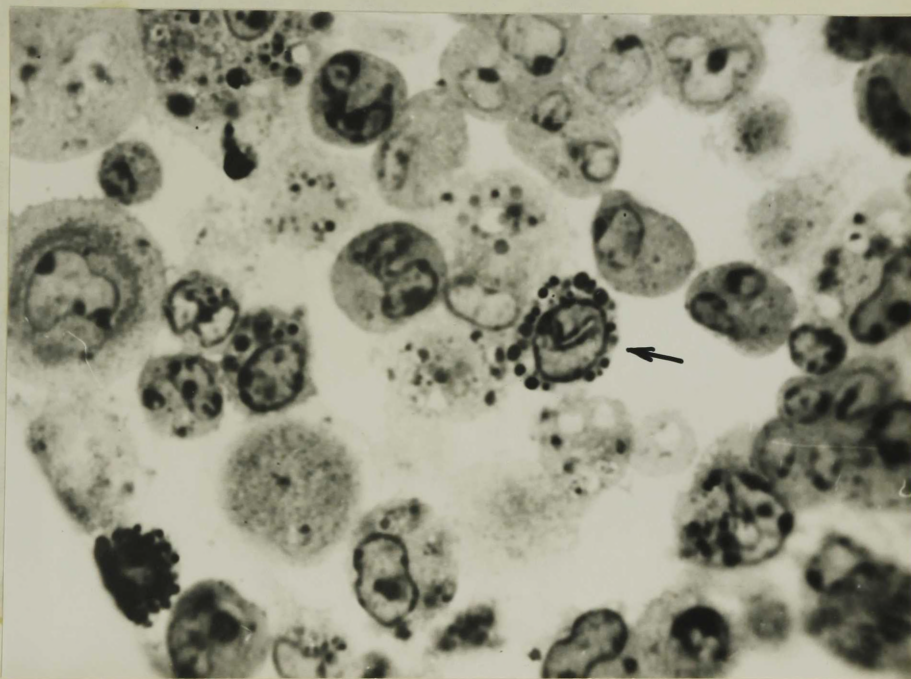


Joon. 11.

Rakukogumikud põrna koekultuurides, M- makrofaag, G- granulotsüüt. Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok. 10x

2.3.2.2. Basofiilsete graanulitega granulotsüüdid

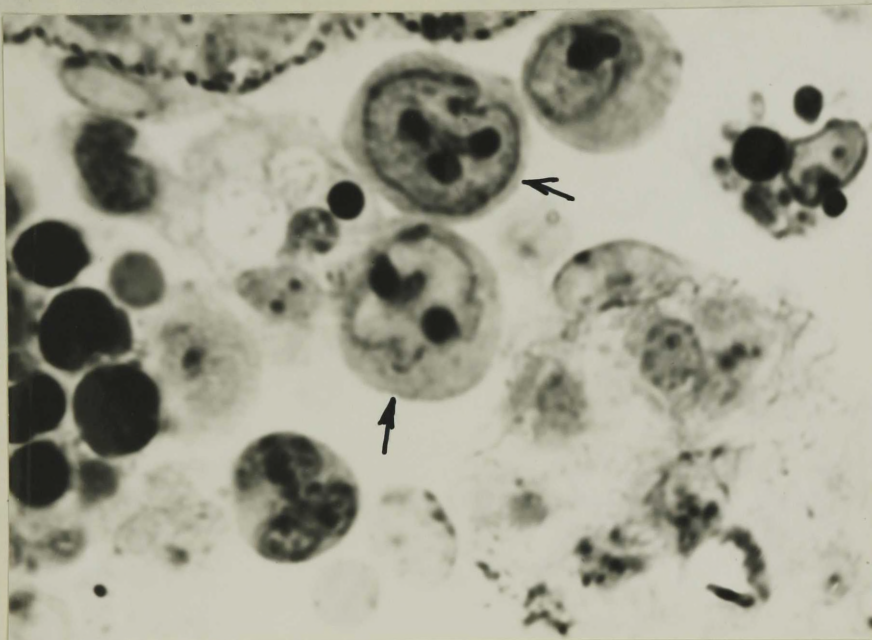
Põrna koekultuuris leidub granulotsüüte, mille tsütoplasmas paiknevad suured basofiilsed graanulid. Selliste granulotsüütide tuum on tugevasti sagardunud. Kromatiini kondensatsioon tuumas on vähene, paikneb rohkem tuumaümbrise läheduses /joon.12/.



Joon.12. Basofiilsete graanulitega granulotsüüt /↑/
põrna koekultuuris. Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud azuur-eosiiniga aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok. 10x

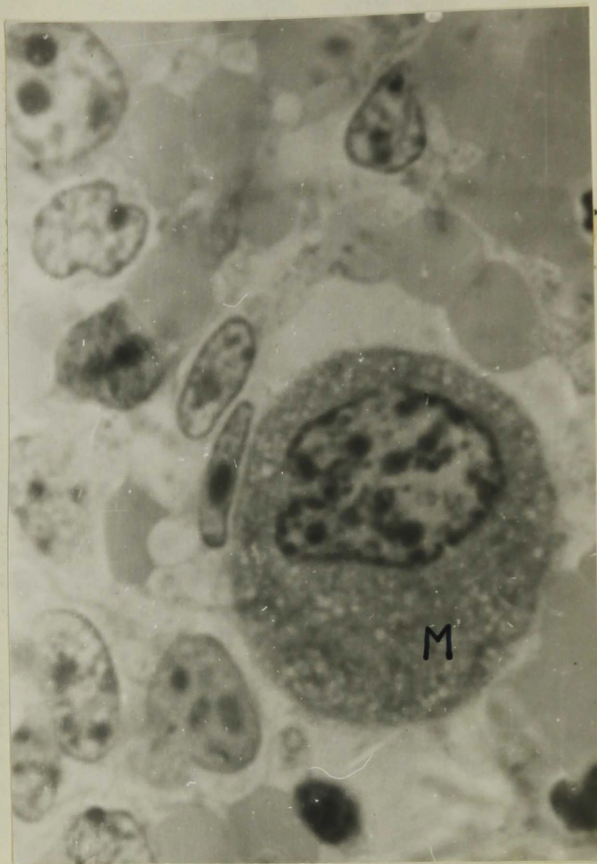
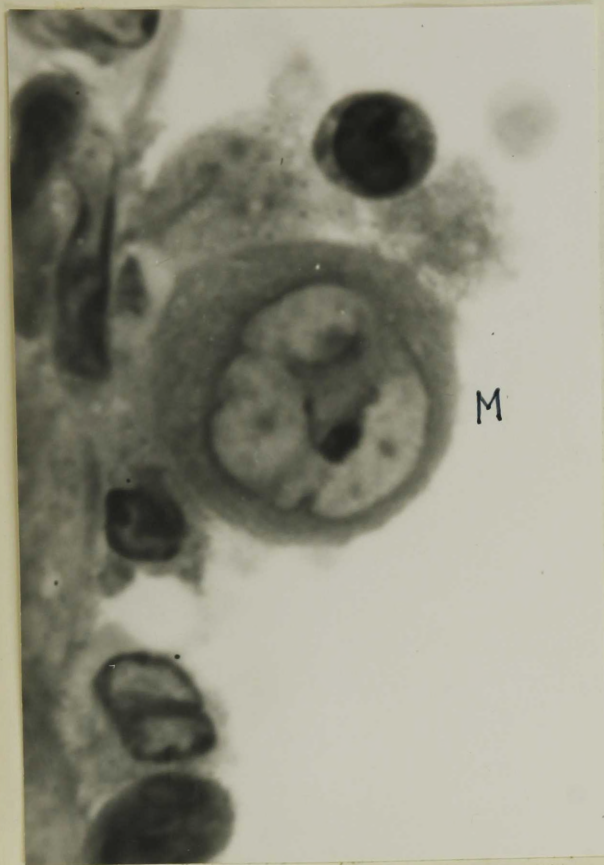
2.3.2.3. Megakarüotsüütide diferentseerumine

Megakarüoblast on koekultuuris suure ebakorrapärase tuumaga, milles paikneb kolm või neli suurt tuumakest. Tsütoplasma on nõrgalt basofiilne ja ilma märgatavate sisaldisteta. Rakude suurus umbes $25...30\ \mu\text{m}$. /joon. 13./.



Joon. 13. Megakarüoblastid /↑/põrna koekultuuris. Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 60x, pk. 10x

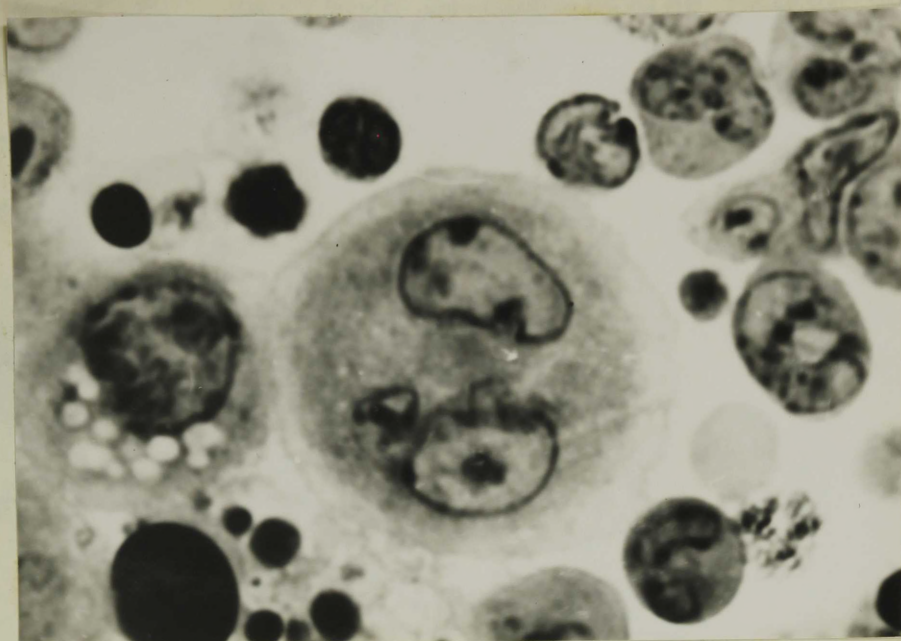
Promegakarüotsüüt on koekultuuris rõngakujulise või sagardunud tuumaga rakk, suurusega $30...70\ \mu\text{m}$. Tuumas võime näha känkudena kondenseerunud kromatiini, mis paikneb ühtlaselt üle kogu tuuma. Tsütoplasma basofiilsus võrreldes megakarüoblastiga on tunduvalt tõusnud. Tsütoplasmas leidub hulgaliselt heledaid vakuole /joon. 14 a, b/.



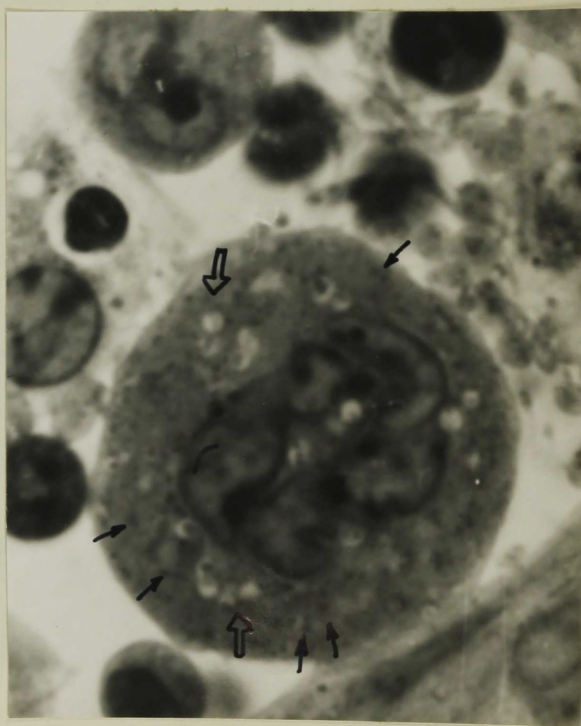
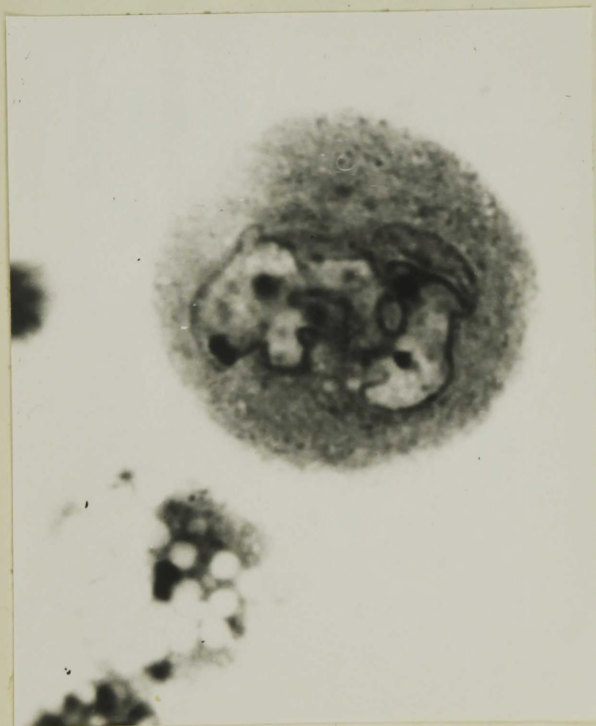
Joon. 14. Megakarüotsüüdid põrna koekultuuris. M - megakarüotsüüt. a/ preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini^{ja} valuselise fuksiiniga, ob. 90x , ok. 10x .b/ ülevaatepreparaat, ob. 90x, ok. 12,5x

Koekultuuris võis täheldada osade promegakarüotsüütide tsütoplasma diplasmaatilisust. Tsütoplasma perifeerne tsoon on erinevalt tsütoplasmast mittebasofiilne, ega sisalda graanuleid ja vakuole /joon. 15/.

Megakarüotsüüt on väga suur rakk, mõõtmetega kuni 100 μ m. Tuum on tugevalt sagardunud ja võrreldes diferentseerumisreeelnevate rakkudega omab suuremat basofiilsust. Tuumas võib täheldada mõningast kromatiini kondenseerumist, megakarüotsüüti iseloomustab arvukate heledate vakuoolide ja graanulite esinemine tsütoplasmas /joon. 16 a, b/.

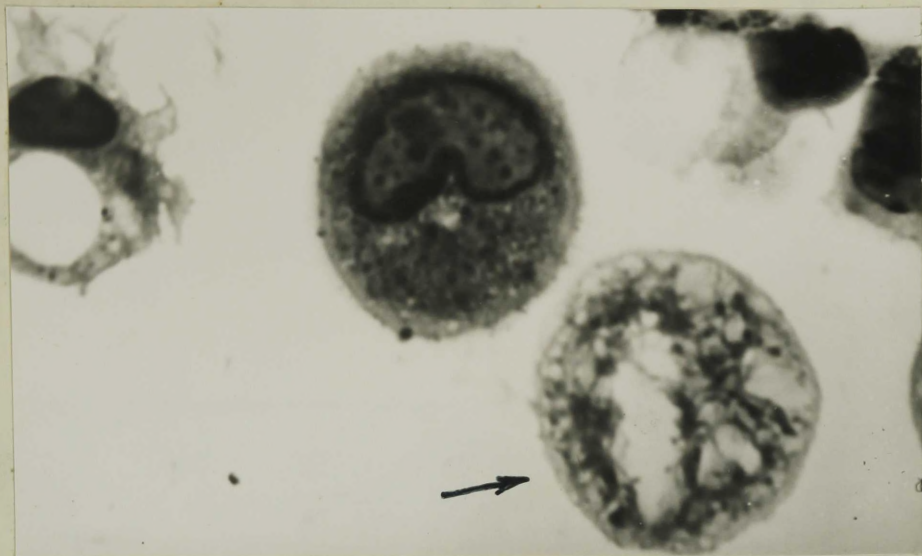


Joon. 15. Heterogeense tsütoplasmaga promegakarüotsüüt koe-
kultuuris. Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist. Vär-
vitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga,
ob. 90x , ok. 10x

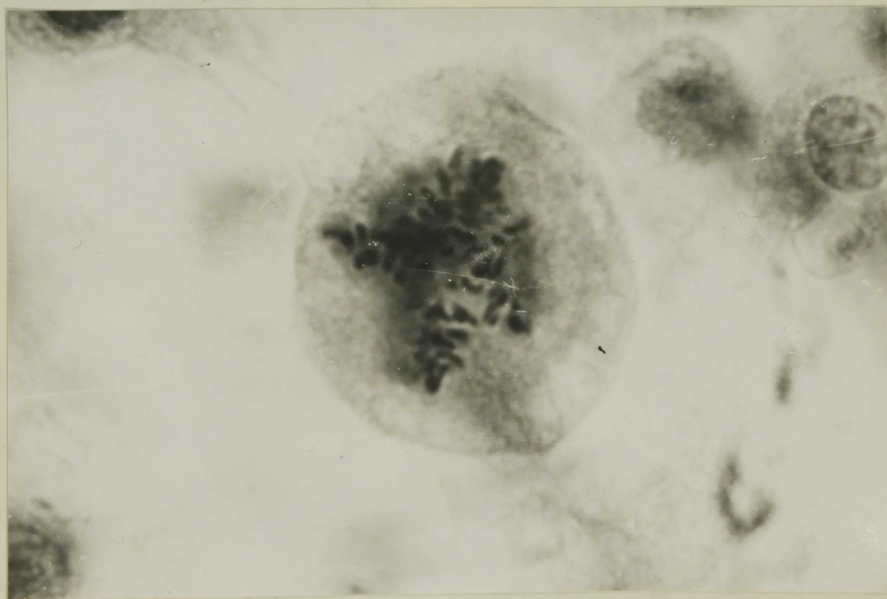


Joon.16. Megakarüotsüüt koe-kultuuris. ↑-heledad vakuoolid,
↑-graanulid. a/ preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist,
värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga,
ob. 60x, ok. 10x, b/ preparaat valmistatud analoogiliselt, ob.
90x, ok. 10x

Osa megakarüotsüütidest kultiveerimise käigus degenerereerub /joon.17/. Ülevaatepreparaatides leidus mõnikord megakarüotsüütidele suuruselt vastavaid rakke, kus võis näha mitmepooluselisi mitoose /joon.18/.



Joon. 17. Degenerereerunud megakarüotsüüt /↑/.Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 60x , ok. 10x

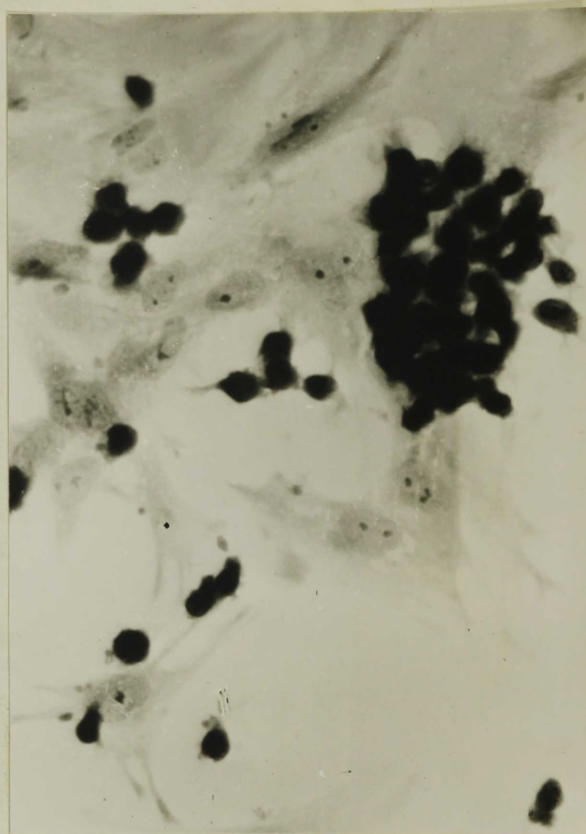
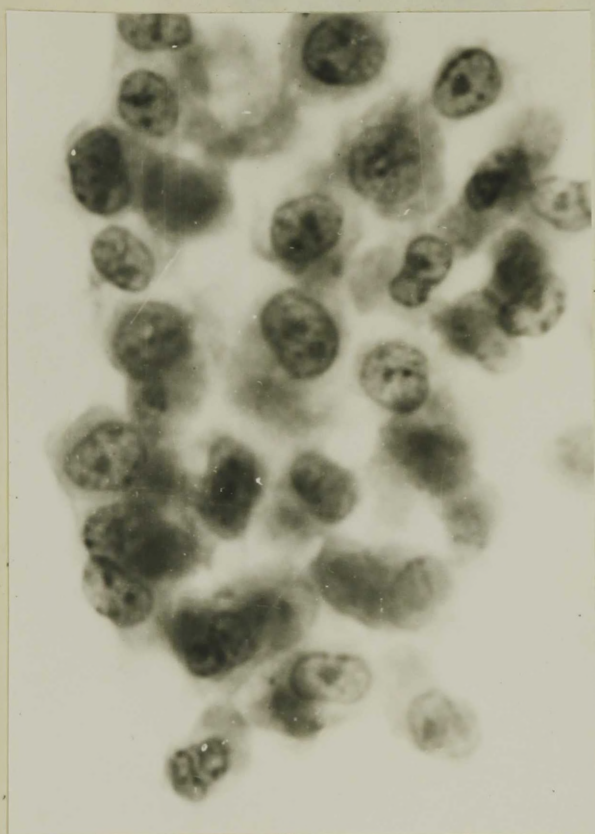


Joon 18. Mitmepooluseline mitoos. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 60x , ok. 12,5x

2.3.2.4. Mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumine

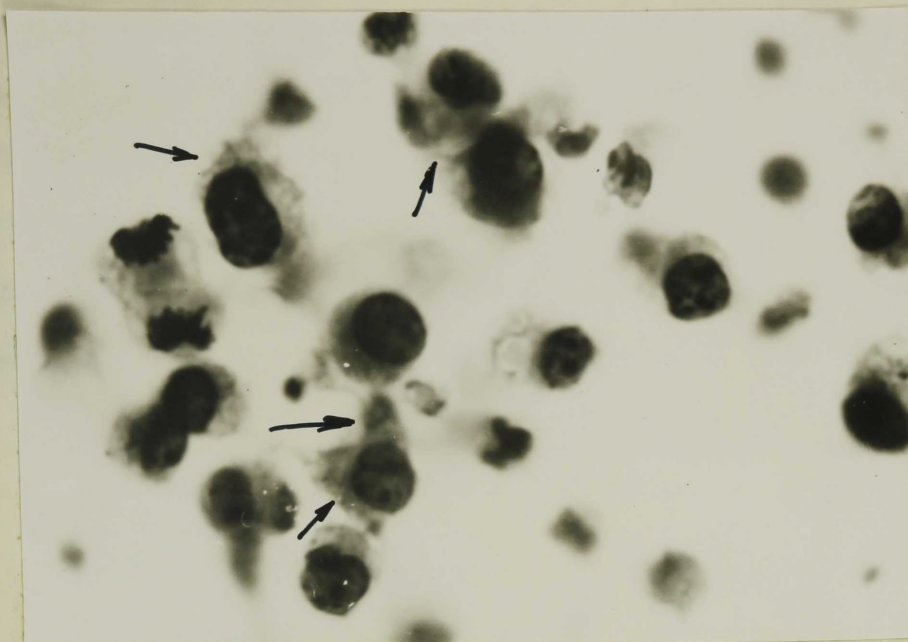
Mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisrea rakud on koekultuuris esinevatest vererakkudest kõige enam esindatud.

Mononukleaaarsed fagotsüüdid paiknevad koekultuuris üksikult või kolooniatena stroomarakkudest moodustunud kasvutsooni peal ning samuti diferentseerunud mononukleaarsete fagotsüütide kasvutsoonis /joon. 19 a, b/.

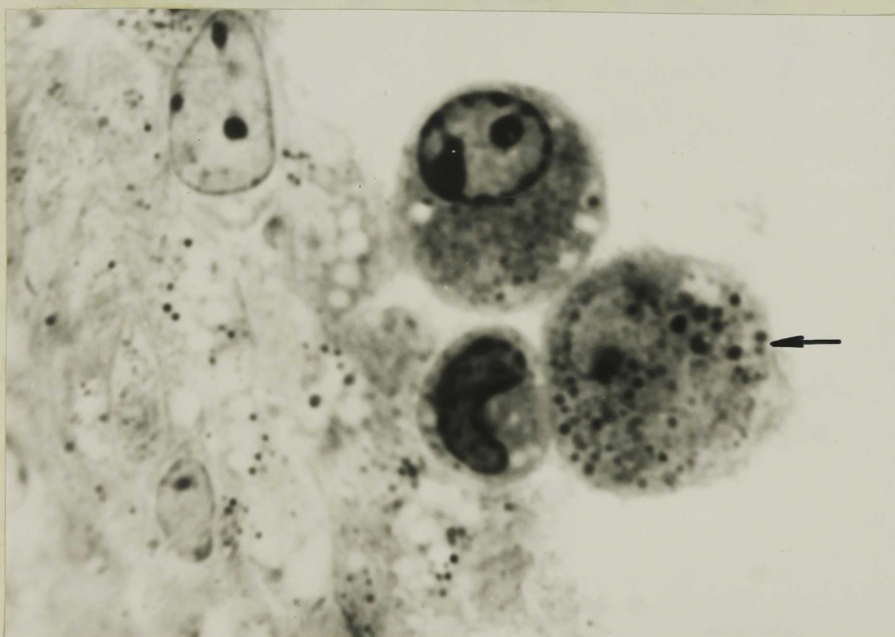


Joon. 19. Mononukleaarsete fagotsüütide kolooniad embrüonaalse põrna koekultuuris. a/ ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob.20x , ok. 12,5x, b/ ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 9x, ok. 12,5x

Monoblast ja promonotsüüt on ümara või ovaalse tuumaga rakud, mis osaliselt lamestuvad kultuuris. Lamestumist näitab üksikute jätkete moodustumine vabal pinnal /joon.20, 22/.



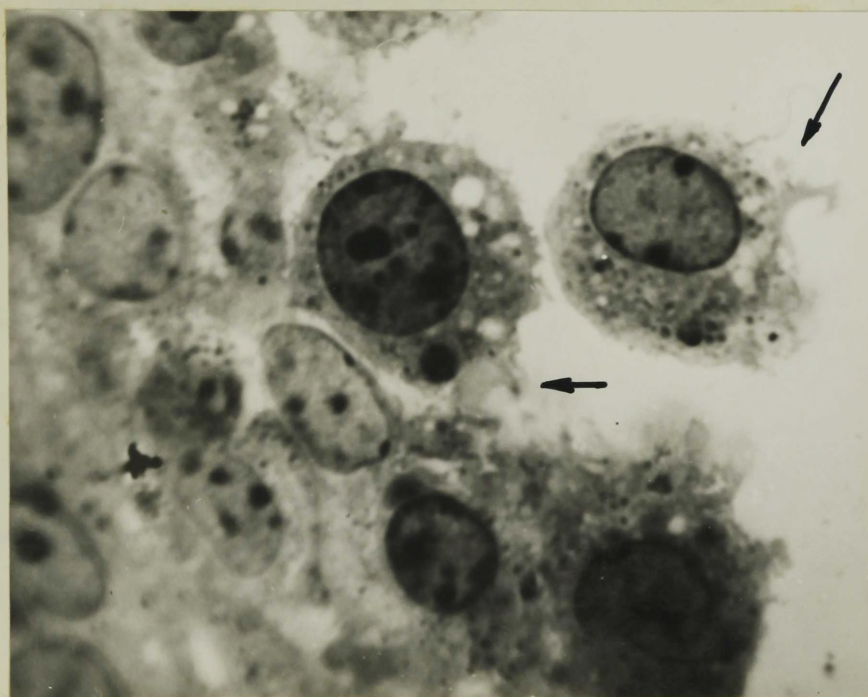
Joon.20. Osaliselt lamedestunud mononukleaarsed fagotsüüdid koekultuuris. ↑-rakujätked. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 20x , ok. 12,5x



Joon.21. Azurofiilsed graanulid /↑/ mononukleaarsetes fagotsüütides. Preparaat epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 60x , ok. 10x

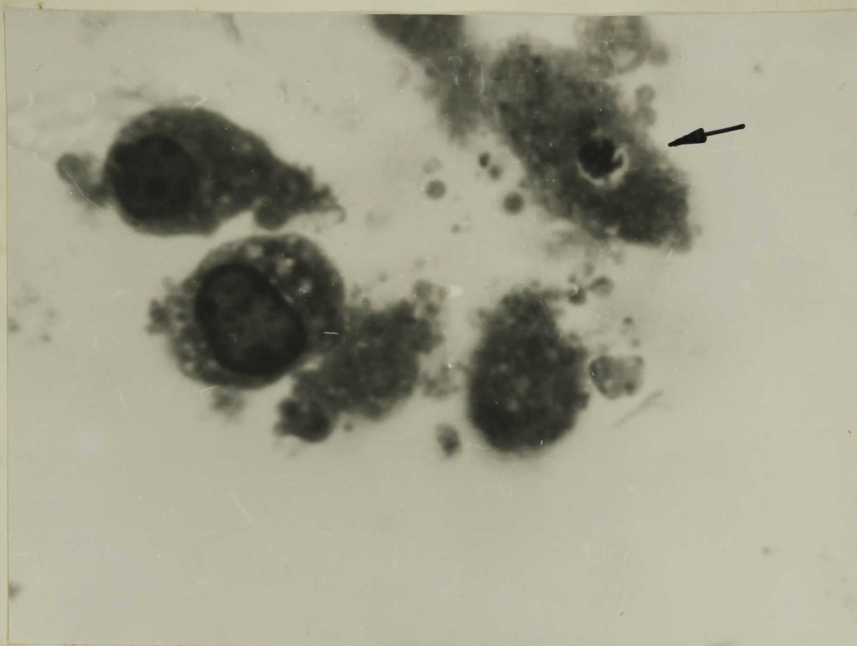
Tuumas võime näha kondenseerunud kromatiini peamiselt tuumaümbrise läheduses. Tsütoplasma on basofiilne. Tuumas on enamasti üks suur tuumake. Huvitav on märkida, et neis rakkudes võib sageli näha azurofiilseid graanuleid /joon. 21/.

Promonotsüütidel võib täheldada vähesel määral ka tsütoplasmaatilisi jätkeid /joon. 22/.

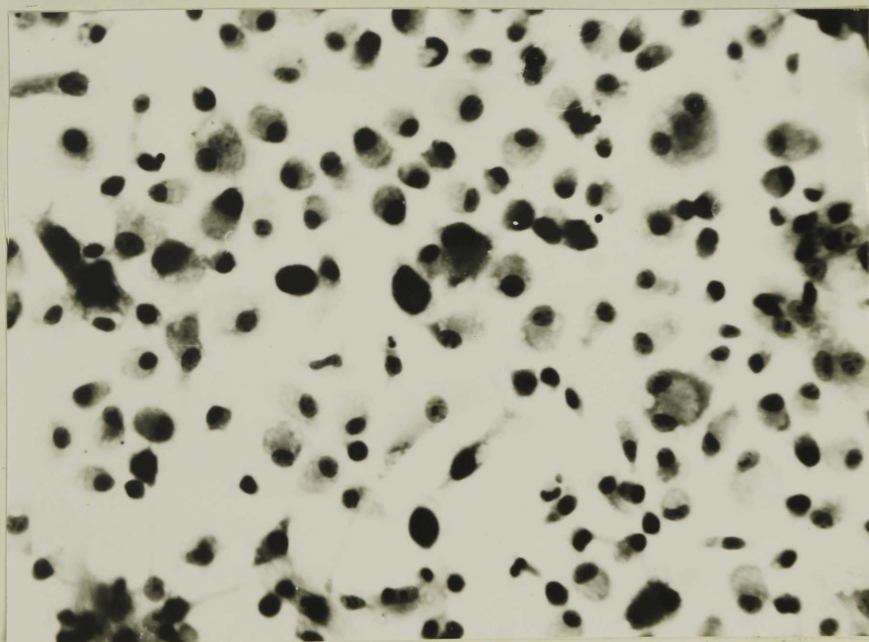


Joon. 22. Tsütoplasmaatilised jätkeid /↑/ promonotsüütidel. Preparaat valmistatud epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiini ja aluselise fuksiiniga, ob. 60x, ok. 10x

Rakkude edasisel diferentseerumisel kultuuris rakupinna jätkete arv suureneb ning granulatsioon tsütoplasmast kaob. Tuum paikneb enamdiferentseerunud rakkudes tavaliselt perifeerselt. Sellised rakud on fagotsütoosivõimelised /joon.23/.



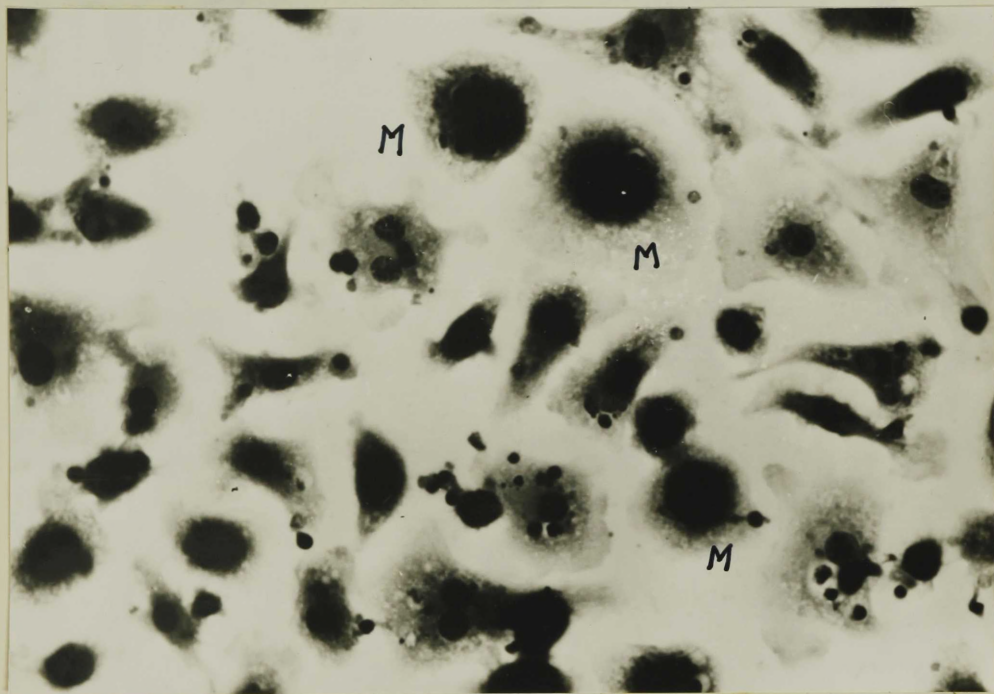
Joon. 23. Fagotsüteeriv rakk /↑/ põrna koekultuuris. Preparaat valmistatud epoksü-vaiku sisestatud materjalist, värvitud polükroomselt azuur-eosiiniga ja aluselise fuksiiniga, ob. 20x, ok. 10x



Joon. 24. Promonotsüütide ja monotsüütide piirkond koe- kultuuris. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 9x, ok. 12,5x

Tüüpilise monotsüüdi morfoloogiaga rakk koekultuuris puudub. Promonotsüüdid ja monotsüüdid säilivad kultuuris hulk aega /kuni 1 kuu/, moodustades kohati iseseisvaid kogumikke või alasid vabal klaasipinnal /joon. 24/.

Kõrvuti eelpooltoodud rakkudega mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisreast võib põrna kultuuris alati leida ka kõrgeltdiferentseerunud rakke s.o. makrofaage /joon.25/. Need rakud pärinevad tõenäoliselt põrna strooma koostises olevatest makrofaagidest.



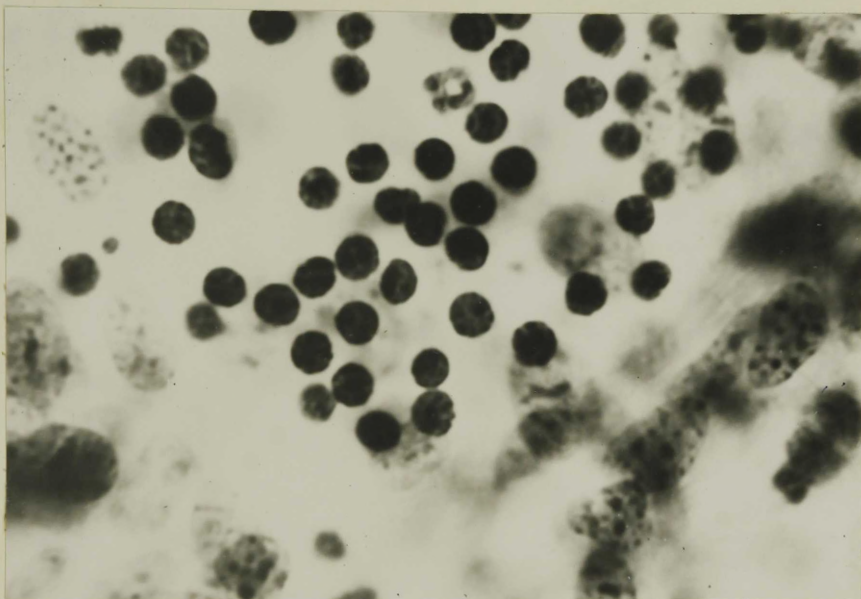
Joon. 25. Makrofaagid /M/ koekultuuris. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 20x , ok. 12,5x

2.3.2.5. Lümfotsüüdid

Vähestel juhtudel säilivad koekultuuris ka lümfotsüüdid.

Lümfotsüüdid paiknevad kogumikena teiste rakkude peal

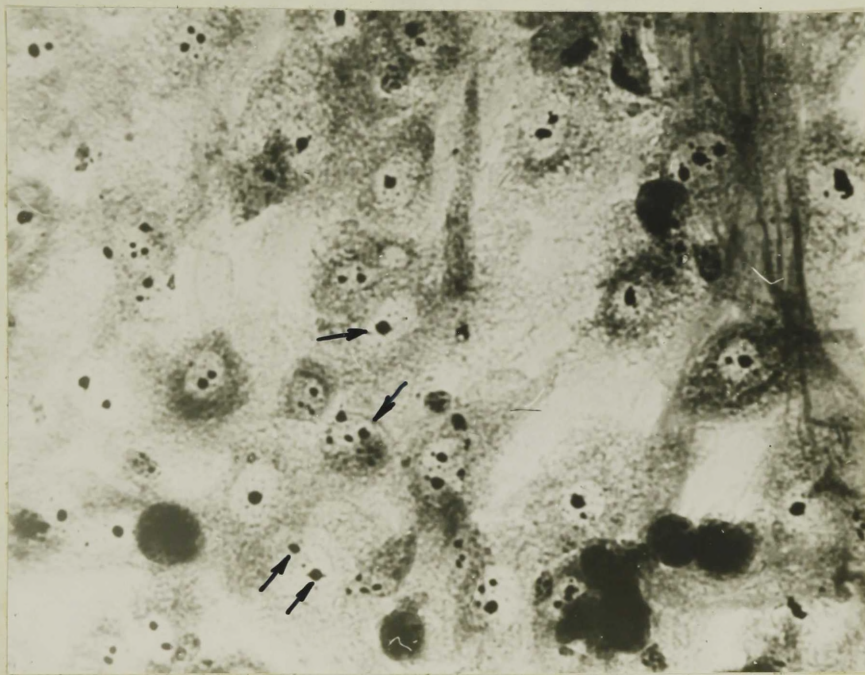
/ joon. 26/.



Joon. 26. Lümfotsüüdid põrna koekultuuris. Ülevaatepreparaat, värvitud hematoksüliin-eosiiniga, ob. 20x , ok. 12,5x

2.3.3. Tuumakese organisaatori piirkonna hõbetumine koekultuurides

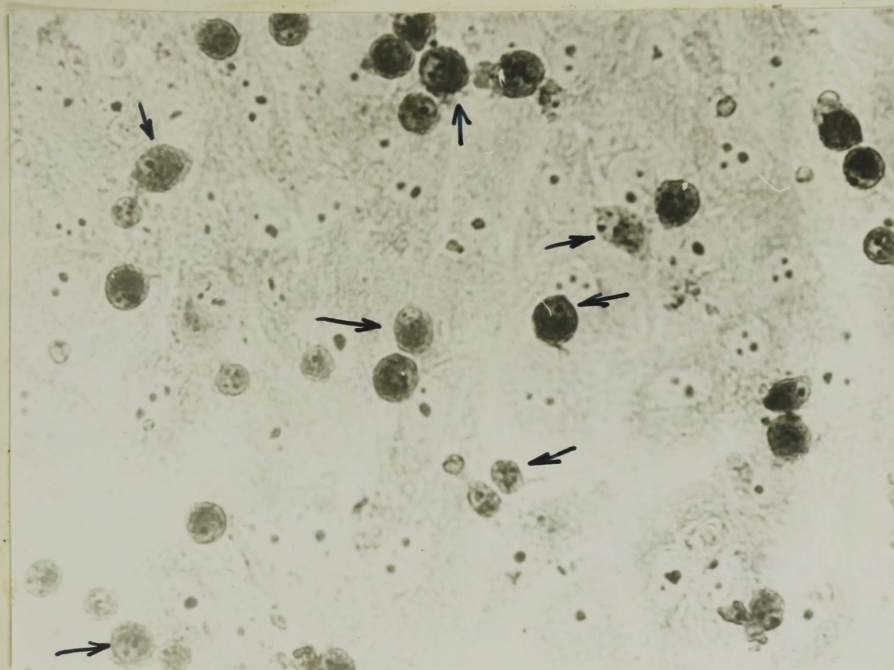
Koekultuuris hõbetub tuumakese organisaatori piirkond kõikides mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisrea rakkudes, samuti ka stroomarakkudes /joon. 27/. Tuumakese organisaatori piirkondade arv on erinevates rakkudes küllaltki varieeruv - 4^{+2} .



Joon. 27. Põrna koekultuur. ↑ - hõbetunud tuumakese organisaatori piirkond. Preparaat värvitud hõbenitraadiga, ob. 20x, ok. 10x

Granulotsüütide diferentseerumisrea rakkudes hõbetub tuumakese organisaatori piirkondsegmenteerumata tuumadega vähemdiferentseerunud rakkudes /joon. 28/. Kõrgelt diferent-

seerunud segmenttuumalistes rakkudes tuumakese organisaa-
tori piirkonna hõbetumist ei täheldatud.



Joonis 28. Põrna koekultuur. ↑ - hõbetunud tuumakese
organisaatori piirkonnaga rakud granulotsüütide differo-
nist. Preparaat värvitud hõbenitraadiga, ob. 20x, ok. 10x

3. A R U T E L U

Rakubioloogia uuringutes on keskse koha omandanud rakkude diferentseerumise põhjuste uurimine. On teada, et rakkude diferentseerumine on terve rea rakus toimuvate protsesside tulemus, mille tõttu rakud omandavad mingi spetsiifilise aine või ainete sünteesivõime /Трумэн, 1976/. Tinglikult võib diferentseerumise jagada biokeemiliseks ja morfoloogiliseks diferentseerumiseks /Bellairs, 1974/. Esimesel juhul on rakkude suunatud areng tuvastatav vaid mingi spetsiifilise aine sünteesi uurimisega. Teisel juhul on areng tuvastatav ka morfoloogiliste tunnuste alusel.

Viimasel ajal on olulisi edusamme teinud vererakkude diferentseerumise uurimine. Selleks oli oluline praktiline vajadus, kuna verehaiguste, sealhulgas leukooside ravi on võimalik vaid teades vererakkude diferentseerumismehhanisme. Samas on ka vererakkude morfoloogiline diferentseerumine hädajälgitav, kuna sellega kaasnevad ainult kindlale differonile omaste rakustruktuuride /näiteks spetsiifiline granulatsioon/ kujunemine.

Intaktne vereloomekude on keeruline koesüsteem, kus normaalsetes tingimustes esinevate differonide rakud ei oma ruumilist eraldatust. Seetõttu ongi vererakkude diferentseerumise uurimiseks laialdaselt kasutusel koekultuurid kui lihtsustatud mudelsüsteemid.

Meie uurisime vererakkude diferentseerumist täiskasvanud hiire luuüdi ja vastsündinud hiire põrna /võrreldav embrüonaalse põrnaga/ koekultuurides, kasutades mitmeid kultiveerimismeetodeid.

Kui luuüdi koekultuuris õnnestus vererakke /seega ka vereloomet/ säilitada vaid viienda kuni kuuenda päevani, siis embrüonaalse põrna koekultuuris püsis vereloome kaks kuni kolm nädalat ja mõnel juhul isegi kauem. Seda, et vereloome luuüdi koekultuuris on ebapüsiv, on täheldatud ka kirjanduses /Лурья, 1972/. Põhjust selle nähtuse seletamiseks on raske leida, võib arvata, et tegemist on põrna ja luuüdi stroomarakkude erineva arenguga koekultuuris. Seda lubab järeldada asjaolu, et põrna koekultuurides on strooma väljakasv intensiivne, aga luuüdi koekultuurides moodustavad stroomarakud vaid harva kasvutsooni ümber tükkeksplantaadi. Et strooma mõjutab vereloome säilumist ja arengut, selle kohta on kirjanduses arvukalt andmeid /Chang, Andersen, 1975; Бутенко, 1978/.

Koekultuurid plastikust Petri tassidel ebaõnnestusid. Nah-tavasti ei olnud plastikust Petri tasside pind sobiv rakkude kinnitumiseks ja lamestumiseks sellel pinnal. Uuritud vereloomeorganite koekultuurides säilib kolm peamist rakkude diferentseerumissuunda : mononukleaarsete fagotsüütide, neutrofiilsete granulotsüütide ja megakarüotsüütide differonid. Lisaks neile kohtame koekultuuris ka arvukate basofiilsete graanulitega vereloomerakke, kuid valgusmikroskoopiline analüüs ei võimalda neid täpselt identifitseerida. Üksikutel juhtudel säiluvad koekultuuris ka lümfotsüüdid. Nende jagunemist kultuuris ei täheldatud.

Üldtunnustatud faktiks on, et mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisrida saab alguse luuüdis, põrnas ja veres paiknevatest vereloome tüvirakkudest /Ван Форт и др., 1973/.

Samal ajal aga puuduvad küllaldased andmed rakkude diferentseerumisstaadiumite morfoloogia kohta.

Meie koekultuurides säilusid kõrvuti kõrgeltdiferentseerunud makrofaagidega rakud, mida me identifitseerisime monoblastideks ja promonotsüütideks. Monoblastid on mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumisrea rakkudest esinev identifitseeritav rakutüüp, kuid teda on leitud vaid koekultuurides /van Furth, Fedorko, 1976/. Monoblastide ja promonotsüütide hulga tõus kultiveerimise käigus annab tunnistust sellest, et nad jagunevad koekultuuris. Tüüpilisi monotsüüte ei õnnestunud meil identifitseerida. On alust arvata, et koekultuurides ei kulge mononukleaarsete fagotsüütide diferentseerumine kirjanduses esitatud skeemi järgi : monoblast → promonotsüüt → monotsüüt → makrofaag. Kultuuris jääb diferentseerumisreas nähtavasti vahele morfoloogiliselt tuvastatav monotsüüdi arengustaadium. Meil ei ole küllaldaselt andmeid ka selle kohta, et promonotsüütidest moodustunud makrofaagid on morfoloogiliselt identsed tüüpiliste kõrgeltdiferentseerunud makrofaagidega intaktsetes koes.

Neutrofiilsete granulotsüütide diferentseerumisrea rakkudes toimub kultiveerimise käigus tuuma sagardumine. Tuumas endas suureneb kromatiini kondensatsioon ehk nn. heterokromatiinsete alade suurenemine. Rakkude küpsemise käigus ilmuvad rakkudesse graanulid. Valgusmikroskoopiliste uuringutega ei ole võimalik neid graanuleid täpselt identifitseerida, kuid kirjanduse andmetel on teada, et elektronmikroskoopiliste uuringutega on võimalik eristada primaarseid, sekundaar-

seid ja spetsiifilisi graanuleid, milliste moodustumine vastab teatud küpsusstaadiumile. Primaarsed graanulid moodustuvad varastes promüelotsüütides, sekundaarsed graanulid moodustuvad hilistes promüelotsüütides ning spetsiifilised graanulid moodustuvad müelotsüütide staadiumis /Bainton et al., 1971; Brederoo, Daems, 1978; Zucker-Franklin, Grusky, 1974/.

Megakarüotsüütide diferentseerumisrea rakkudes suurenevad küpsemise käigus nii tuuma kui ka kogu raku mõõtmed, ulatudes kuni 100 μm . Küpsemise käigus ilmnevad tsütoplasmas graanulid ja heledad vakuoolid. Huvitava faktina võis täheldada osa megakarüotsüütide tsütoplasma heterogeensust, kui perifeerne faas erinevalt ülejäänud tsütoplastmast ei sisalda graanuleid ja vakuole ning on mittebasofiilne.

Kultuuris võis täheldada degenerereeruvaid megakarüotsüüte ning trombotsüütide moodustumisest ei õnnestunud meil kultuuris leida.

Koekultuurides rakkude tuumakese organisaatori piirkonna hõbetamine andis positiivse tulemuse kõikides mononukleaarsete fagotsüütide rea rakkudes ning stroomarakkudes. Granulotsüütide diferentseerumisrea rakkudest hõbetus tuumakese organisaatori piirkond kõikides segmenteerumata tuumaga rakkudes. Meie andmed ühtivad kirjanduse andmetega, mis näitavad, et tuumakese organisaatori piirkond hõbetub vaid geneetiliselt aktiivsetes rakkudes /Schwarzacher et al., 1978; Mikelsaar, Schwarzacher, 1978/.

K O K K U V Õ T E

Käesolevas töös uuriti täiskasvanud hiire luuüdi ja ^{hiire} vastsündinud põrna tükkeksplantaat-koekultuure.

Luuüdi ja põrna koekultuurid erinesid teineteisest vereloome säilumise aja poolest. Luuüdi koekultuuris säilis vereloome vaid viis kuni kuus päeva, aga põrna koekultuuris säilis vereloome kuu aja jooksul. Vereloome säilumine sõltub stroomarakkude väjakasvust tükkeksplantaadist. Luuüdi koekultuurides moodustavad stroomarakud harva kasvutsooni tükkeksplantaadi ümber, kuid põrna koekultuuris toimub aga väga intensiivne stroomarakkude väljakasv tsentraaltükist.

Uuritud koekultuurides säilusid kolm peamist vereloome rakkude diferentseerumissuunda. Nendeks olid mononukleaarsete fagotsüütide, neutrofiilsete granulotsüütide ja megakarüotsüütide differonid. Esitatud töös identifitseeriti eri küpsusastmel olevaid diferentseerumissuundade rakke morfoloogitiste tunnuste alusel.

Kasutatud koekultuurid osutusid sobivaks mudelsüsteemiks vereloome erinevate diferentseerumissuundadega rakkude morfoloogia tundmaõppimisel.

K A S U T A T U D K I R J A N D U S

Bainton, D.F., Ulliyot, J.I., Farquhar, M.J. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocyte in human bone marrow.- "J.Exp.Med.", 1971, vol. 134, p. 907...934.

Bellairs, R. Cell differentiation. In: "Cell Med.Sci.vol. 2. Cellular genet., develop. and cellular spec.", London-NY., 1974, p. 249...282.

Bentfeld-Barker, M.E., Bainton, D.F. Ultrastructure of rat megakaryocytes after prolonged thrombocytopenia.-"J.of Ultrastruct.Res.," 1977, vol.61, p. 201...214.

Brederoo, P., Daems, W.T. The ultrastructure of Guinea pig heterophil granulocytes and the heterogeneity of the granules.-"Cell and Tissue Research", vol.194, 1978, p.183...205.

Chan, S.H., Metcalf, D. Local production of colony stimulating factor within the bone marrow. Role of non-hematopoietic cells.-"Blood", 1977, vol.40, p. 646...649.

Chang, Y.T., Andersen, R.N. Cultivation of mouse bone marrow cells.-"Journal of the Reticuloendothelial Society", 1975, vol.18, p. 34...43.

Cline, M.J., Golde, D.W. Cellular interaction in the control of granulopoiesis."Bollettino della Instituto Sieroterapico Milanese", 1975, vol.34, p. 164...167.

Cline, M.J., Sumner, M.A. Bone marrow macrophage precursors. I Some functional characteristics of the early cells of the mouse macrophage series.-"Blood", 1972, vol.40, p.62...69.

Dicke, K.A., van Noord, M.J., Maat, B., Schaefer, U.W., van Bekkum, D.W. Identification of cells in primate bone marrow resembling the hemopoietic stem cell in the mouse.- "Blood", 1973, vol. 42, p. 195...207.

Djaldetti, M., Ovadia, J., Bessler, H., Fishman, P., Halbrecht, I. Ultrastructural study of the erythropoietic events in human embryonic livers.- "Biol. Neonate", 1975, vol. 26, p. 367...374.

Fukuda, T. Undifferentiated mononuclear cell in human embryonic liver; presumptive hematopoietic stem cell.- "Virchows Arch. Abt. B Zellpath.", 1973, vol. 14, p. 31...34.

van Furth, R., Fedorko, M.E. Ultrastructure of mouse mononuclear phagocytes in bone marrow.- "Laboratory Investigation", 1976, vol. 34, p. 440...450.

Goodpasture, C., Bloom, S.E. Visualization of nuclear organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining.- "Chromosoma", 1975, vol. 53, p. 37...50.

Gordon, S., Cohn, Z.A. The macrophage. In: "Mononuclear phagocytes", N.Y., 1970, p. 171...212.

Goud, T., Schotte, C., Furth, R. van. Identification and characterization of the monoblasts in mononuclear phagocyte colonies grown in vitro.- "J. Exp. Med.", 1979, vol. 142, p. 1180...1199.

Hofgärtner, F.J., Schmid, H., Krone, W., Zenzes, M.T., Engel, W. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in silver staining.- "Chromosoma", 1979, vol. 71, p. 197...216.

Hansmann, I., Gebauer, I., Bihl, L., Grimm, T. Onset of nucleolus organizer activity in early mouse embryogenesis and evidence for its regulation. "Exp. Cell Res.", 1978, vol. 114, p. 263...268.

Haskill, J.S., McKnight, R.D., Galbraith, P.R. Cell-cell interaction in vitro: studied by density separation of colony forming, stimulating and inhibiting cells from human bone marrow. "Blood", 1972, vol. 40, p. 394...395.

Hirsch, I.G., Fedorko, M.E. Morphology of mouse mononuclear phagocytes. In: "Mononuclear phagocytes", N.Y., 1970, p. 7...28.

Inzumi, T., Haltori, a., Sanada, M., Muto, M. Megakaryocyte and platelet formation: a scanning electron microscope study in mouse spleen. "Arch. Histol. Jap.", 1977, vol. 40, p. 305...320.

Li, C.Y., Yam, Lung T., Crosby, W.H. Histochemical characterization of cellular and structural elements of the human spleen. "The Journal of Histochemistry and Cytochemistry", 1972, vol. 20, p. 1049...1058.

Lozzio, B.B. Regulations of cell division. A review: endogenous mitotic inhibitors of hemopoietic cells. "Exp. hemat.", 1973, vol. 1, p. 309...339.

Maul, G.G., Deaven, L. Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content. "J. Cell. Biol.", 1977, vol. 73, p. 748...760.

McCuskey, P.A., McCuskey, R.S., Meinem, H.A. Studies of hemopoietic microenvironment. III In vivo microscopic and histochemical study of allografts of bone marrow in the hamster cheek pouch chamber. "Expl. Hemat.", 1975, vol. 3, p. 297...308.

van der Meer, J.W.M., Beelen, R.H.J., Fluitsma, D.M., van Furth, R. Ultrastructure of mononuclear phagocytes developing in liquid bone marrow cultures. A study on perox. act. - "J.Exp.Med.", 1979, vol. 149, p. 17...26.

Metcalf, D., MacDonald, H.R., Odartchenko, N., Sordat, B. Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. - "Proc. Nat. Acad. Sci. USA", 1975, vol. 72, p. 1744...1748.

Metcalf, D., Moore, M.A.S. Haemopoietic cells. "Frontiers of Biology," Amsterdam, London, 1971, vol. 24.

Mikelsaar, A.V., Schwarzacher, H.G. Comparison of silver staining of nucleolus organizer regions in human lymphocytes and fibroblasts. - "Hum. Genet.", 1978, vol. 42, p. 291...299.

Parmley, R.T., Ogawa, M., Spicer, S.S., Wright, N.Y. Ultrastructure and cytochemistry of bone marrow granulocytes in culture. - "Exp. Hematol.", 1976, vol. 4, p. 75...89.

La Pushin, R.W., Trentin, J.J. Identification of distinctive stromal elements in erythroid and neutrophil granuloid spleen colonies: light and electron microscopic study. - "Expl. Hemat.", 1977, vol. 5, p. 505...522.

Reed, R.E. The effect of corticotropin on mouse spleen colony-forming cells. - "Blood", 1974, vol. 44, p. 393...399.

Reilly, F.D., McCuskey, R.S., Meineke, H.A. Studies of the hemopoietic microenvironment, Adrenergic and cholinergic innervation of the murine spleen. - "Anat.Rec.", 1976, vol. 189, p. 109...118.

Ritslaid, V. Töökaitse II. Töötervishoid. - Tartu, 1971, TRÜ, rotaprint, 283 lk.

Romeo, D., Cramer, R., Marzi, T., Soranzo, M.R., Zabucchi, G., Rossi, F. Peroxidase activity of alveolar and peritoneal macrophages.- "Journal of the Reticuloendothelial Society", 1973, vol. 13, p. 399...409.

Rubinstein, A.S., Trobaugh, F.E. Ultrastructure of presumptive hematopoietic stem cell.- "Blood", 1973, vol. 42, p.61...80.

Schwarzacher, H.G., Mikelsaar, A.V., Schnedl, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions.-"Cytogenet. Cell Genet.", 1978, vol. 20, p. 24...39.

Sidebottom, E., Deak, J.J. The function of the nucleolus in the expression of genetic information: studies with hybrid animal cells .-"International Review of Cytology", 1976, vol. 44, p. 29...53.

Spicer, S.S., Hardin, J.H. Ultrastructure , cytochemistry, and function of neutrophil leucocyte granules.-"Lab. Invest.", 1969, vol. 20, p. 488...497.

Spicer, S.S., Horn, R.G., Wetzel, B.K. Ultrastructural and cytochemical characteristic of leucocytes in various stages of development .-"Biochem. Pharmacol., suppl", 1968, p. 143...157.

Spector, W.G. The macrophage : its origins and role in pathology.-In: "Pathobiology Annual", 1974, p. 33...64.

Spector, W.G. Chronic inflammation.- In: "The Inflammatory Process", 1974, vol. 3, p. 277...289.

Zucker-Franklin, D., Grusky, G. Ultrastructural analysis of hematopoietic colonies derived from human peripheral blood.- "J. Cell Biol.", 1974, vol. 63, p. 855...863.

Tantravahi, R., Dev, V.G., Miller, D.A., Miller, O.I.

Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human hybrids.-"J. of Cell Biol.", 1976, vol. 70, p. 79...81.

Tarbijate elektriseadmete ekspluatatsioonieskirjad.

Tarbijate elektriseadmete ekspluatatsiooni ohutuseeskirjad.

Kinnitatud Riikliku Energiajärelvalve Inspektsiooni poolt 12. aprillil 1969, täiendused kinnitatud 3. veebruaril ja 17. mail 1971.-Tallinn, 1972.-360 lk.

Tavassoli, M. Studies on hemopoietic microenvironments.-

"Expl. Hemat.", 1975, vol. 3, p. 213...226.

Trentin, J.J. Influence of hematopoietic organ stroma

/hematopoietic inductive microenvironments/ on stem cell differentiation.-In: "Regulation of hematopoiesis", ^(N.Y.) 1970, vol. 1, p. 161...186.

Weiss, L. The hematopoietic microenvironment of bone

marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats.-

"Anat. Res.", 1976, vol. 186, p. 161...184.

Wetzel, B.K., Horn, R.G., Spicer, S.S. Fine structural

studies on the development of heterophil, eosinophil and basophil granulocytes in rabbits.-"Lab. Invest"., 1967, vol. 16, p. 349...382.

Wolf, N.S. Dissecting the hematopoietic microenvironment.

Stem cell lodgment and commitment, and the proliferation and differentiation of erythropoietic descendants in the Sl/S1^d mouse.-"Cell Tissue Kinet", 1974, vol. 7, p. 89...98.

Бутенко З. А. Стволовые кроветворные клетки и лейкоз.

Киев, "Наукова думка", 1978.

Дьюкар Э. Клеточные взаимодействия в развитии

животных. М., "Мир", 1978.

Епифанова О. И. Гормоны и размножение клеток. М.,

"Наука", 1965.

Карр Я. Макрофаги. М., "Медицина", 1978.

Конюхов Б. В. Генетический контроль клеточной

дифференцировки. - "Успехи совр. биол.", 1973, т. 76,

с. 171...188.

Лурия Е. А. Кроветворная и лимфоидная ткань в куль-

турах. М., 1972.

Мицкевич М. С. Гормональные регуляции в онтогенезе

животных. М., "Наука", 1978.

Пирс Э. Гистохимия. М., 1962.

Полежаев А. В. Регенерация и дедифференцировка. -

"Архив анатомии", 1974, т. 66, с. 102...114.

Правила по технике безопасности и производственной санитарии при работе в химических лабораториях высших и средних специальных учебных заведений. Утверждены постановлением Президиума ЦК профсоюза работников просвещения, высшей школы и научных учреждений 11 июня 1965 г. - Бюлле-

тень министерства высшего и среднего специального образования СССР, 1966, II с. 5...9.

Санитарные нормы проектирования промышленных предприятий СН 245-71. Утверждены Государственным Комитетом Совета Министров СССР по делам строительства 5. ноября 1971 г. - М., 1972, -95 с.

Старостин В. И., Мичурина Т. В. Строма кроветворных органов и ее взаимодействие со стволовой кроветворной клеткой. Морфология человека и животных. - "Антропология. Итоги науки и техники", ВИНТИ, М., 1977, т. 7, с. 59...110.

Токин И. Б. Электронномикроскопический анализ процесса дифференцировки и дедифференцировки клеток. - "Архив Анатомии, Гистологии и Эмбриологии", 1972, т. LXII, с. 46...62.

Трумэн Д. Биохимия клеточной дифференцировки. М., "Мир", 1976.

Ван Фюрт Р., Конне З., Хирш Дж., Хамфри Дж., Спектор У., Лангеворт Г. Система мононуклеарных фагоцитов: новая классификация макрофагов, моноцитов и их клеток-предшественников. - "Бюлл. ВОЗ", 1973, т. 46, с. 814...820.

Хрущов Н. Т. Гистогенез соединительной ткани. М.,

"Наука", 1976.

Чертков И. А., Воробьев А. Н. Современная схема
крововетворения. - "Пробл. гематол. и перемев. крови", 1973,
т. 18, с. 3....13.

Чертков И. Л., Фриденштейн А. Я. Клеточные основы
крововетворения. М., "Медицина", 1977.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

А.Ю.Кыйвеэр

Резюме

В представленной работе исследовались кусочковые эксплантаты тканевых культур костного мозга взрослых мышей и эмбриональной селезенки мышей. Кроветворные клетки в культурах костного мозга сохранялись лишь в течении пяти или шести дней, тогда когда они в культурах эмбриональной селезенки продолжали размножаться до месяца. Последнее явление зависит от миграции стромальных клеток из кусочкового эксплантата. В культурах костного мозга стромальные клетки редко образовали зону роста вокруг кусочкового эксплантата. Но в культурах эмбриональной селезенки происходила интенсивная миграция стромальных клеток из центрального кусочка.

В изученных тканевых культурах сохранялись три основных линии дифференцировки клеток: были выявлены диффероны мононуклеарных фагоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и мегакариоцитов. В данной работе идентификация клеток тканевой культуры при разной степени зрелости производилась по морфологическим признакам.

Примененные методики тканевых культур оказались весьма полезными модельными системами для изучения морфологических особенностей кроветворных клеток в разных стадиях дифференцировки.

SOME MORPHOLOGICAL CRITERIONS ON BLOOD
CELL DIFFERENTIATION

A. Kõiveer

Summary

Some morphological criterions have been investigated in adult mice bone marrow culture and in embryonic mice spleen cultures. In spleen cultures hematopoiesis lasted about a month, but in bone marrow cultures it lasted only five to six days. The time of hematopoiesis in tissue cultures depended on stroma cell migration.

In investigated cultures three main differentiation strains of hematopoiesis have been preserved. Those are: mononuclear phagocyte , neutrophilic granulocyte and megacaryocyte differons. Investigated cells have been described by morphological characteristics. As a conclusion we may say, that those tissue cultures have been fitting models for experiencing cell morphology.

A. Kõiveer